

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Mecanismos reguladores del proceso de aclimatación a las  
temperaturas bajas en Arabidopsis mediados  
por RNAS no codificantes largos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Diego Gómez Martínez**

Directores

**Julio Salinas Muñoz  
Rafael Catalá Rodríguez**

**Madrid**



**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**MECANISMOS REGULADORES DEL PROCESO DE  
ACLIMATACIÓN A LAS TEMPERATURAS BAJAS EN  
ARABIDOPSIS MEDIADOS POR RNAS NO  
CODIFICANTES LARGOS**

**TESIS DOCTORAL**

**Diego Gómez Martínez**

**Directores**

**Julio Salinas Muñoz  
Rafael Catalá Rodríguez**



**Centro de Investigaciones  
Biológicas, CSIC  
Departamento de Biotecnología  
Microbiana y de Plantas**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**TESIS DOCTORAL**

**MECANISMOS REGULADORES DEL PROCESO DE  
ACLIMATACIÓN A LAS TEMPERATURAS BAJAS EN  
ARABIDOPSIS MEDIADOS POR RNAS NO  
CODIFICANTES LARGOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Diego Gómez Martínez**

Trabajo realizado en el Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC de Madrid, bajo la dirección del Doctor Julio Salinas Muñoz y del Doctor Rafael Catalá Rodríguez

VºBº de los directores de la tesis

**Julio Salinas Muñoz**

**Rafael Catalá Rodríguez**

**Diego Gómez Martínez  
Madrid, 2019**





UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. DIEGO GÓMEZ MARTÍNEZ,  
estudiante en el Programa de Doctorado BIOQUÍMICA, BIO. MOLECULAR Y BIOMED.,  
de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

MECANISMOS REGULADORES DEL PROCESO DE ACLIMATACIÓN A LAS TEMPERATURAS  
BAJAS EN ARABIDOPSIS MEDIADOS POR RNAS NO CODIFICANTES LARGOS

y dirigida por: JULIO SALINAS MUÑOZ Y RAFAEL CATALÁ RODRÍGUEZ

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 19 de septiembre de 20 19

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



*Lo que hacemos en la  
vida, tiene su eco en la  
eternidad.*

Gladiator



## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero darle las gracias al Dr. Julio Salinas por permitirme realizar la tesis doctoral bajo su dirección. De la misma manera, por su apoyo, dedicación y optimismo también quiero agradecer al Dr. Rafael Catalá la dirección de esta tesis, así como su supervisión constante durante toda mi estancia en el laboratorio. También quiero agradecer al Dr. Javier Lacadena por su supervisión como tutor y facilitarme mucho los trámites anuales del programa de doctorado.

También me gustaría dar las gracias al Dr. Crisanto Gutierrez por acogerme en su laboratorio y facilitarme todo el material necesario para realizar los ensayos de ChIP, y a la Dra. Bénédicte Desvoves por guiarme y enseñarme durante este experimento.

A continuación, quiero agradecer al Dr. José Antonio Jarillo, al Dr. César Llave, y al Dr. Yijun Qi por cedernos amablemente varios de los mutantes y líneas transgénicas utilizadas durante esta Tesis.

En estos momentos quiero acordarme del grupo de *Los Matamala*, y agradecerles los buenos momentos que pasamos tanto dentro como fuera del CIB. Por supuesto, agradecer a *La Habitación del Galáctica* por ser los mejores amigos que uno puede tener y, hasta en los momentos malos, ser capaces de hacerme reír hasta que me duela la cabeza. No quiero olvidarme de los compañeros de clase de la Universidad, atrás queda ya la decisión que tomamos la mayoría de realizar la Tesis Doctoral. Muchas gracias por el apoyo de todos estos años.

Desde luego, esta Tesis no hubiera sido posible sin el apoyo inestimable de mis compañeros de laboratorio. Gracias a Carlos por hacer más amena mi llegada al laboratorio y por enseñarme y transmitirme el protocolo de RIP. A Ema por aguantar mis meteduras de pata los primeros años y tener gran paciencia conmigo. A Nandy por ser la persona más imprescindible del laboratorio, y tenerlo todo bajo control. Muchas gracias a Javi por sus buenos consejos tanto profesionales como personales y por la enorme ayuda en las discusiones científicas que siempre supusieron un paso adelante en este trabajo. Gracias a Edu por levantar el ánimo del laboratorio y sacarme siempre una sonrisa, aunque sea a primera hora de la mañana. Y muchas gracias a Peter por estar siempre ahí, ayudándome tanto dentro del trabajo como fuera de él.

Quiero darle las gracias a la persona que más me ha ayudado durante los últimos años. Helen, muchas gracias por estar siempre conmigo y hacerme feliz. Gracias por tener siempre una sonrisa en la cara, que me alegraba las mañanas en el laboratorio y me las sigue alegrando fuera de él. Eres el mejor resultado de mi Tesis. Te quiero.

Por último, quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional. Mamá, Papá, Jose y Sandra (y Molly). Quiero pedirlos disculpas por tenerlos preocupados este último año y quiero que sepáis que os quiero.



## ÍNDICE



## **Índice**

RESUMEN	17
SUMMARY	21
1. INTRODUCCIÓN	25
1.1. Regulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas de las plantas a estrés abiótico	26
1.1.1. Regulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación mediada por los CBFs	27
1.1.2. Otros mecanismos de regulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación	28
1.2. Los RNAs largos no codificantes como nuevos elementos reguladores de la expresión génica	29
1.2.1. Mecanismos de regulación de la expresión génica mediados por lncRNAs	30
1.2.1.1. Mecanismos de regulación epigenética	31
1.2.1.2. Mecanismos de regulación transcripcional	31
1.2.1.3. Mecanismos de regulación post-transcripcional	32
1.2.1.4. Mecanismos de regulación traduccional y post-traduccional	33
1.3. Los RNAs largos no codificantes en plantas	33
1.3.1. Mecanismos de regulación epigenética mediados por lncRNAs en plantas	33
1.3.2. Mecanismos de regulación transcripcional mediados por lncRNAs en plantas	35
1.3.3. Mecanismos de regulación post-transcripcional mediados por lncRNAs en plantas	35
1.4. Planteamiento de la tesis, hipótesis de trabajo y objetivos	36
2. MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	41
2.2. Tratamientos experimentales	42
2.3. Secuenciación de lncRNAs	42
2.4. Análisis de la expresión génica	43
2.4.1 Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa	43
2.4.2. Análisis de la expresión génica de lncRNAs mediante RT-PCR semicuantitativa	43
2.5. Localización celular	43
2.6. Inmunoprecipitación de RNA nuclear in vivo	44
2.7. Inmunoprecipitación de cromatina	46
2.8. Programas informáticos y análisis estadísticos	48

3. RESULTADOS	53
3.1. Identificación y caracterización molecular de RNAs largos no codificantes de Arabidopsis implicados en la respuesta a temperaturas bajas	53
3.2. Identificación de mutantes para los RNAs largos no codificantes RICA1-4	57
3.3. Caracterización funcional de RICA1	60
3.3.1. RICA1 regula positivamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis	60
3.3.2. RICA1 promueve el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas a través de una vía independiente a las definidas hasta ahora	62
3.4. Caracterización funcional de RICA2	64
3.4.1. RICA2 regula negativamente la tolerancia constitutiva de Arabidopsis a las heladas	64
3.4.2. RICA2 regula negativamente la tolerancia constitutiva a las heladas en Arabidopsis a través de la vía de señalización mediada por NPR1	67
3.4.3. La demetilasa LDL1 regula negativamente la tolerancia constitutiva a las heladas en Arabidopsis a través de la vía de señalización mediada por NPR1	69
3.5. Caracterización funcional de RICA3	71
3.5.1. RICA3 regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis	71
3.5.2. RICA3 atenúa el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis controlando la expresión de CBF2	71
3.5.3. RICA3 controla la inducción de CBF2 en respuesta a las temperaturas bajas y el proceso de aclimatación en Arabidopsis a través de la vía RdDM	75
3.6. Caracterización funcional de RICA4	76
3.6.1. RICA4 regula positivamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis	76
3.6.2. RICA4 controla el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis atenuando la expresión de los CBFs	78
3.6.3. RICA4 atenúa el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas interaccionando con PRC2 para controlar la deposición de la marca represora H3K27me3 en la región cromosómica de CBF3	80
4. DISCUSIÓN	87
4.1. RNAs largos no codificantes como nuevos reguladores del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis	87
4.2. RICA1 regula positivamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis a través de una vía de señalización independiente a las descritas hasta ahora	88
4.3. RICA2 regula negativamente la tolerancia constitutiva de Arabidopsis a las heladas controlando parcialmente la expresión génica mediada por NPR1 en respuesta a las temperaturas bajas	89

4.4. RICA3 atenúa la inducción por frío de CBF2 a través de la vía RdDM para modular el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas	90
4.5. RICA4 reprime la inducción de CBF3 en respuesta a temperaturas bajas a través de PRC2 asegurando el correcto desarrollo del proceso de aclimatación	93
5.CONCLUSIONES	101
6.BILBIOGRAFÍA	105
ANEXO I. ABREVIATURAS	117
ANEXO II. OLIGONUCLEÓTIDOS	123





Mecanismos reguladores del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis* mediados por RNAs no codificantes largos.

El estrés producido por las temperaturas bajas afecta de un modo importante a la supervivencia, al desarrollo y a la distribución de las plantas y limita el rendimiento de los cultivos. En las regiones templadas, muchas especies de plantas han desarrollado una respuesta adaptativa, denominada proceso de aclimatación a las temperaturas bajas, mediante el cual aumentan su tolerancia a las temperaturas de congelación después de estar expuestas durante unos días a temperaturas bajas entre 0 y 10°C. El proceso de aclimatación es muy complejo y lleva consigo importantes cambios fisiológicos y bioquímicos, la mayor parte de ellos regulados mediante cambios en la expresión génica. Entender los mecanismos moleculares que median estos cambios es de interés tanto básico como aplicado.

Los RNAs no codificantes largos (lncRNAs) se definen como moléculas de RNA con una longitud mayor de 200 nucleótidos que no codifican proteínas y han emergido recientemente en eucariotas como elementos clave de la regulación de la expresión génica. En plantas, la investigación sobre lncRNAs está todavía en sus inicios y pese a que diferentes análisis transcriptómicos han permitido identificar miles de ellos, a día de hoy, se desconocen muchas de las funciones de los lncRNAs en la regulación de sus procesos biológicos. Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto la existencia de cuatro lncRNAs de *Arabidopsis* a los que denominamos *REGULATED IN COLD ACCLIMATION (RICA) 1-4* cuyos niveles están regulados por las temperaturas bajas.

En esta tesis nos planteamos como hipótesis que estos lncRNAs estarían implicados en la regulación de la respuesta de *Arabidopsis* a las temperaturas bajas. Para validar esta hipótesis nos propusimos los siguientes objetivos. i) Caracterizar molecularmente *RICA1*, *RICA2*, *RICA3* y *RICA4* y ii) Caracterizar funcionalmente *RICA1*, *RICA2*, *RICA3* y *RICA4* en la respuesta de *Arabidopsis* a las temperaturas bajas. Los resultados revelaron que los cuatro lncRNAs identificados modifican su expresión en respuesta a frío y participan en la respuesta de *Arabidopsis* a las temperaturas bajas. *RICA1* regula positivamente el proceso de aclimatación a frío a través de una vía independiente a vías de señalización principales de este proceso. Por otro lado, *RICA2* es un regulador negativo de la tolerancia constitutiva a la congelación que actúa bloqueando la expresión de parte de la vía de señalización mediada por NPR1. *RICA3* modula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas mediante el silenciamiento de *CBF2* a través de su participación en la vía de metilación de DNA mediada por RNA (RdDM). Por último, *RICA4* es un regulador negativo del proceso de aclimatación que actúa atenuando la inducción por frío de *CBF3* mediante el control de la actividad del complejo Polycomb 2 (PRC2). Estos resultados demuestran el papel esencial de los lncRNAs en el control de

procesos fisiológicos tan importantes como la respuesta a las temperaturas bajas. Además, resalta la complejidad de los mecanismos de regulación del proceso de aclimatación, donde parecen jugar un papel relevante en el control de vías clave como la de los *CBFs* o la mediada por el factor de transcripción NPR1.





Molecular mechanisms regulating Arabidopsis low temperature response mediated by long non-coding RNAs.

Low temperature stress has major effects on plant development, survival, and distribution limiting crop yield. In temperate regions, many plant species have developed an adaptive response termed cold acclimation through which their tolerance to low temperature is increased after being exposed to temperatures in the range of 0 to 10°C for a few days. Cold acclimation is a very complex process involving important physiological and biochemical changes that are largely mediated by changes in gene expression. Understanding the molecular mechanisms underpinning these changes is a goal for both fundamental and applied research. Long non-coding RNAs (lncRNAs), defined as RNA molecules longer than 200 base pairs in length without significant coding potential, have emerged lately as key players in eukaryotic gene expression regulation. In plants, multiple transcriptomic analysis have identified thousands of lncRNAs but their functional role remains to be described for the immense majority of them.

Preliminary results in our lab had identify four lncRNAs in Arabidopsis, named *REGULATED IN COLD ACCLIMATION (RICA)* 1-4, which expression was regulated by low temperature. We hypothesized that these lncRNAs might play a role in the cold acclimation process. To demonstrate this role we established two goals: i) Perform a molecular characterization of *RICA*1-4; ii) Characterize the putative function of *RICA*1-4 in cold signaling. Our results revealed that the four lncRNAs identified, play a role in Arabidopsis cold response though by different means. *RICA1* is a positive regulator of cold acclimation through a novel mechanism that is independent of the cold signaling pathways described to date. In contrast, *RICA2* is a negative regulator of Arabidopsis basal freezing tolerance blocking part of the NPR1-dependent signaling pathway. *RICA3* modulates cold acclimation by silencing *CBF2* expression through a mechanism that involves the RNA-directed DNA methylation pathway. Finally, *RICA4* is also a negative regulator of the cold acclimation process by tuning down *CBF3* cold induction through the regulation of the activity of Polycomb Repressive complex 2 (PRC2). These results uncover the essential role of lncRNAs to the cold acclimation response regulating key pathways, like the CBF and NPR1 pathways. At the same time, these results highlight the extreme complexity of the regulatory mechanisms that govern the cold acclimation process.



## **1. INTRODUCCIÓN**





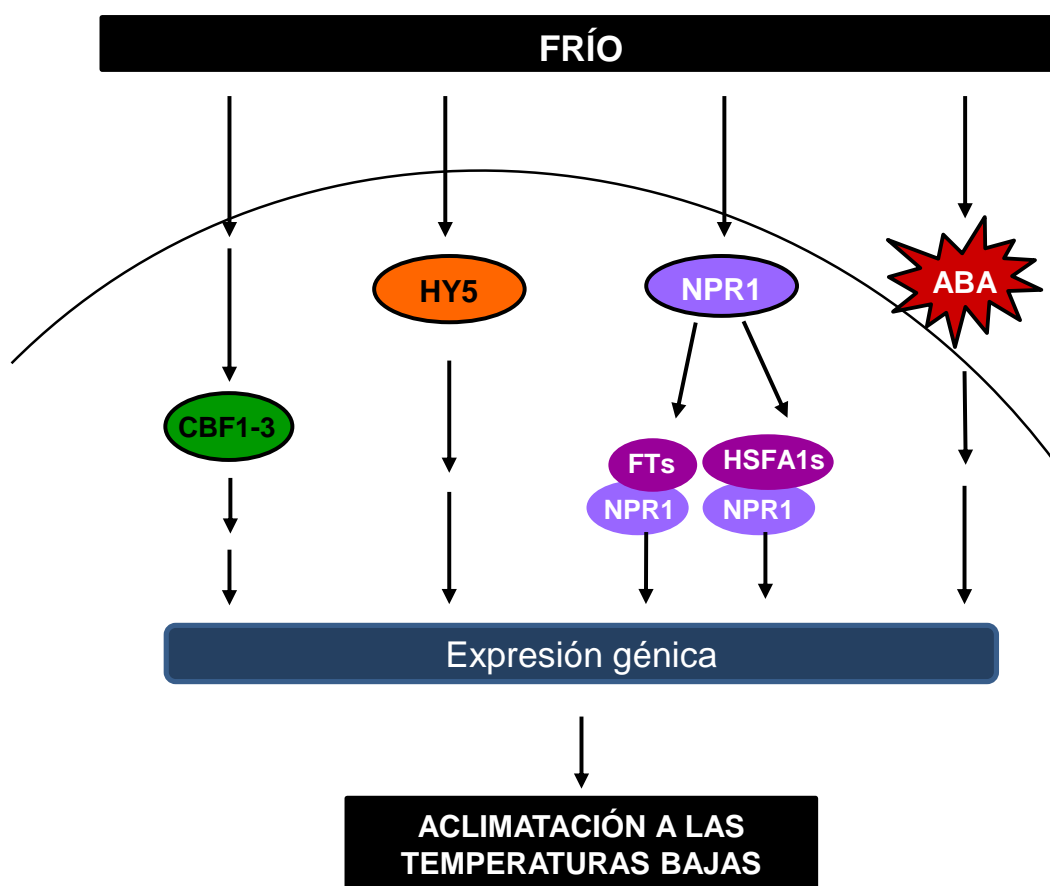
## **1.INTRODUCCIÓN**

Los seres vivos tienen que enfrentarse a condiciones ambientales que, en muchas ocasiones, afectan de manera importante a su supervivencia. En este sentido, las temperaturas bajas limitan el desarrollo de las plantas y su distribución, así como el rendimiento de los cultivos (Levitt, 1980). En las regiones templadas, numerosas especies han adquirido una respuesta adaptativa, denominada proceso de aclimatación a las temperaturas bajas, mediante la cual aumentan su tolerancia a las heladas tras estar expuestas unos días a temperaturas entre 0 y 10°C (Levitt, 1980; Thomashow, 1999). Durante este proceso, las plantas no solo ven incrementada su tolerancia a la congelación, sino que también aumentan su tolerancia a otros estreses abióticos relacionados como la sequía o la salinidad (Thomashow, 1999; Baier et al., 2018). El proceso de aclimatación es muy complejo y lleva consigo numerosos cambios a nivel fisiológico y bioquímico, la mayor parte de ellos controlados por las temperaturas bajas a través de variaciones en la expresión génica (Thomashow, 1999). Comprender los mecanismos moleculares que controlan estos cambios no solo es interesante desde un punto de vista básico, para entender cómo las plantas se desarrollan y reproducen en condiciones adversas, sino también, desde un punto de vista aplicado, ya que permitiría desarrollar herramientas moleculares útiles para la obtención de nuevos cultivos más tolerantes al estrés ambiental.

La activación del proceso de aclimatación requiere, en primer lugar, la percepción del descenso de la temperatura y la subsecuente generación de unas señales que parecen estar mediadas por el aumento transitorio de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y de la concentración de diferentes hormonas como el ácido abscísico (ABA) (Knight, 1996; Plieth et al., 1999; Catalá, 2003; Chen et al., 1983; Lang et al., 1994). Posteriormente, esta señal activaría distintas respuestas adaptativas, como el aumento en la acumulación de solutos osmoprotectores, de proteínas anticongelantes y de la actividad antioxidante (Koster y Lynch, 1992; Wanner y Junttila, 1999; Airaki et al., 2012). Como se ha comentado anteriormente, la mayor parte los cambios que tienen lugar durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas se encuentran estrechamente regulados al nivel de la expresión génica a través de complejas vías de señalización interconectadas entre sí (Shi et al., 2018).

### 1.1. Regulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas

El proceso de aclimatación a las temperaturas bajas se encuentra finamente regulado por diferentes vías de señalización dependientes de distintas hormonas y factores de transcripción (Barrero-Gil y Salinas, 2018; Shi et al., 2018). La vía que controla el proceso de aclimatación que ha sido más estudiada es la mediada por familia de activadores transcripcionales denominados CBFs (Figura 1). Además, otras vías como la dependiente de ABA o las reguladas por los factores de transcripción HY5 y NPR1, también tienen un papel clave en el desarrollo del proceso de aclimatación (Figura 1).



**Figura 1. Representación esquemática de las principales vías de señalización que participan en la regulación del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.**

La bajada de temperaturas provoca una activación de factores de transcripción y hormonas que regulan la expresión génica durante el proceso de aclimatación. Se han identificado cuatro vías principales mediadas por los factores de transcripción CBFs, HY5 y NPR1 y el ABA.

### 1.1.1. Regulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación mediada por los CBFs

La familia de factores de transcripción CBFs juega un papel central en la regulación del proceso de aclimatación, activando la expresión de multitud de genes *COR* (*cold regulated genes*) en respuesta a temperaturas bajas (Stockinger et al., 1997; Jaglo-Ottosen et al., 1998; Medina et al., 1999; Novillo et al., 2004, 2007). En *Arabidopsis* esta familia está compuesta por 3 miembros (CBF1, CBF2 y CBF3), cuyos genes están localizados en tándem en el cromosoma 4 (Gilmour et al., 1998; Liu et al., 1998; Medina et al., 1999). En respuesta a las temperaturas bajas, la expresión de los *CBFs* aumenta rápidamente y de manera transitoria (Gilmour et al., 1998; Liu et al., 1998; Medina et al., 1999). Los CBFs reconocen el motivo CRT/DRE (CCGAC) que se encuentra en la región promotora de muchos genes *COR*, activando su expresión (Baker et al., 1994; Yamaguchi-Shinozaki et al., 1994; Zhao et al., 2016). El análisis comparativo de mutantes de falta de función de los *CBFs* ha puesto de manifiesto que, pese a que la mayoría de los genes que regulan son comunes, existen genes cuya expresión es inducida específicamente por cada uno de ellos (Novillo et al., 2007; Jia et al., 2016; Shi et al., 2017; Zhao et al., 2016). La relación existente entre los propios CBFs no está clara. Inicialmente, se describió que CBF2 podría regular negativamente la expresión de *CBF1* y *CBF3* (Novillo et al., 2004). Sin embargo, estudios más recientes, utilizando mutantes generados por CRISPR/CAS9, sugieren que *CBF1* y *CBF3* no están controlados por CBF2 sino que, al contrario, serían estos los que regularían negativamente a *CBF2* (Zhao et al., 2016). Esta contradicción pone de manifiesto la necesidad de estudios adicionales que ayuden a esclarecer estas discrepancias.

La expresión de los *CBFs* está fuertemente controlada a través de una compleja red de señalización, en la que participan mecanismos de regulación transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona (Barrero-Gil y Salinas, 2018). En el control de la expresión de los *CBFs* al nivel transcripcional están implicadas distintas hormonas y factores de transcripción. Se ha descrito que hormonas como los brasinoesteroides, el ácido jasmónico, el etileno y las giberelinas pueden actuar modulando la expresión de los *CBFs* (Eremina et al., 2016; Li et al., 2017; Hu et al., 2013; Shi et al., 2012; Catalá et al., 2014; Achard et al., 2008; Richter et al., 2013). También se han identificado numerosos factores de transcripción capaces de regular la expresión de los *CBFs*. El primero que se identificó fue el regulador positivo ICE1, cuya fosforilación a 4°C es necesaria para su unión a los promotores de los *CBFs* y activar su expresión, asegurando así una respuesta rápida a la señal de frío (Gilmour et al., 1998; Chinnusamy et al., 2003; Kim et al., 2015). Posteriormente, se han identificado otros factores de transcripción que regulan positivamente la expresión de los *CBFs*, como ICE2, CAMTA3, CAMTA5, BZR1, CES y CCA1, y diferentes reguladores negativos, como MYB15, EIN3, PIF3, PIF4, PIF7, TOC1,

PRR5, PRR7, PRR9 y SOC1 (Kim et al., 2015; Doherty et al., 2009; Kidokoro et al., 2017; Li et al., 2017; Eremina et al., 2016; Shi et al., 2012; Agarwal et al., 2006; Jiang et al., 2017; Lee y Thomashow, 2012; Keily et al., 2013; Nakamichi et al., 2009, 2012; Seo et al., 2009).

La expresión de los *CBFs* también está regulada al nivel post-transcripcional y post-traducciona. El transporte de los mensajeros correspondientes a los *CBFs* al citoplasma está controlado por proteínas localizadas en los poros nucleares como LOS4 o NUP160 (Gong et al., 2002, 2005). Estas proteínas aseguran el flujo de mensajeros *CBFs* al citoplasma para su traducción y, por tanto, son necesarias para el correcto desarrollo del proceso de aclimatación (Gong et al., 2002, 2005). Por otro lado, modificaciones post-traduccionales de los *CBFs*, como su fosforilización o ubiquitinación, también son necesarias para que la respuesta adaptativa se lleve a cabo adecuadamente (Popescu et al., 2009; Liu et al., 2017).

#### 1.1.2. Otros mecanismos de regulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación

De los más de 4000 genes cuya expresión varía durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas, menos del 20% están controlados por los *CBFs* (Zhao et al., 2016; Jia et al., 2016) lo que indica que otros factores de transcripción y vías de señalización tienen que estar implicados en la regulación de la expresión génica durante esta respuesta adaptativa. En este sentido, se ha descrito que el ABA regula positivamente la tolerancia de las plantas a las heladas (Heino et al., 1990). La exposición a temperaturas bajas ocasiona un aumento en la biosíntesis de ABA y el tratamiento de plantas con ABA exógeno provoca un aumento en la tolerancia a las temperaturas de congelación (Chen y Gusta, 1983; Lång et al., 1989; Heino et al., 1990; Gilmour y Thomashow, 1991). Además, diferentes estudios con mutantes deficientes o insensibles a esta hormona han puesto de manifiesto que el ABA promueve el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas mediante la inducción de la expresión de diferentes genes *COR* (Heino et al., 1990; Llorente et al., 2000; Xiong et al., 2001). Posteriormente, se ha descrito que distintos intermediarios de la vía de señalización del ABA también juegan un papel clave en la regulación de la respuesta de aclimatación (Zhang et al., 2015).

HY5 un factor transcripcional de tipo bZIP fundamental en la señalización por luz, ha sido descrito como un activador esencial del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas (Catalá et al., 2011). La expresión de *HY5* se induce transitoriamente en respuesta a este estrés (Catalá et al., 2011). Se ha demostrado que los niveles de la proteína HY5 son regulados post-traduccionamente por la ligasa de ubiquitina E3 COP1 que, en condiciones de oscuridad, ubiquitina a HY5 para que, posteriormente, sea degradado vía

proteosoma (Osterlund et al., 2000). Tanto en respuesta a luz como a frío, COP1 es excluido del núcleo, lo que promueve la acumulación de HY5 y, consecuentemente, su actividad promotora de la expresión génica (Catalá et al., 2011). La función de HY5 en la inducción de la expresión génica a 4°C está mediada, principalmente, por su unión a elementos Z-Box (ATACGTGT) presentes en los promotores de sus genes diana (Catalá et al., 2011). HY5 regula la inducción del 10% de los genes COR entre los que se encuentran genes implicados en la biosíntesis de antocianinas, como *CHS* o *CHI*, pigmentos esenciales para proteger a la planta de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Catalá et al., 2011). Se ha propuesto que HY5 integra las señales mediadas por frío y por luz para optimizar la supervivencia de las plantas a las temperaturas de congelación (Catalá et al., 2011).

NPR1, un factor de transcripción clave en la respuesta de *Arabidopsis* a organismos patógenos (Fu y Dong, 2013), también juega un papel importante en el control del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas, promoviendo la expresión de genes inducibles por frío (Olate et al., 2018). En condiciones control, NPR1 se encuentra formando oligómeros en el citoplasma. Al exponer la planta a temperaturas bajas, además de inducirse la expresión del gen correspondiente, se favorece la formación de monómeros de NPR1 que son traslocados al núcleo donde interaccionan con la familia de factores de transcripción HSFA1s (Olate et al., 2018). Esta interacción, provoca la activación de numerosos genes que codifican chaperonas necesarias para estabilizar proteínas y estructuras celulares en condiciones de temperaturas de congelación (Olate et al., 2018). NPR1 interaccionaría, además, con otros factores de transcripción, aún no identificados, para inducir la expresión de otros genes durante el proceso de aclimatación (Olate et al., 2018).

## **1.2. Los RNAs largos no codificantes como nuevos elementos reguladores de la expresión génica**

En los últimos años, los resultados obtenidos a partir de las técnicas de secuenciación masiva han desvelado que, en contra de lo que se había asumido, la mayor parte del genoma de eucariotas es transcripcionalmente activo. (Dunham et al., 2012). Según la Enciclopedia de Elementos de DNA (ENCODE), al menos el 80% del genoma humano se transcribe, pero únicamente el 2% corresponde a RNAs que son traducidos (Dunham et al., 2012; Derrien et al., 2012). De este modo, se han podido identificar numerosos transcritos no codificantes (ncRNA) con funciones biológicas hasta ahora desconocidas (Djebali et al., 2012; Mattick, 2011). Estos ncRNAs se han clasificado en dos grupos principales: ncRNAs *housekeeping* [RNAs ribosómicos (rRNAs), RNAs transferentes (tRNAs), RNAs pequeños nucleares (snRNAs) y RNAs pequeños nucleolares

(snoRNAs)], y ncRNAs reguladores (Wu et al., 2016). Los ncRNA *housekeeping* se expresan constitutivamente y tienen papeles muy relevantes en la biosíntesis de proteínas y en la regulación post-transcripcional de la expresión génica (Wu et al., 2016; Yao et al., 2019). Los ncRNAs reguladores, por su parte, se clasifican a su vez en RNAs pequeños (sRNAs) y largos (lncRNAs) (Wu et al., 2016). A diferencia de los sRNAs, el estudio de los lncRNAs se encuentra en una fase muy temprana.

Los lncRNAs se definen como moléculas de RNA con una longitud mayor de 200 nucleótidos que no codifican proteínas (Iyer et al., 2015). Son transcritos principalmente por las RNAs polimerasas II o III, aunque en plantas también pueden transcribirse por las RNAs polimerasas IV y V, y pueden tener intrones y cola de poliadenina (Wierzbicki, 2012; Matzke et al., 2015; Ariel et al., 2015). Por lo general, los lncRNAs se localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma, sus niveles son menores que los de los RNAs que codifican proteínas, y la expresión de los genes correspondientes suele ser específica de tejido (Cabili et al., 2011; Derrien et al., 2012). Evolutivamente los lncRNAs están menos conservados a nivel de secuencia que los mRNAs, sin embargo, sus estructuras secundarias parecen encontrarse altamente conservadas (St.Laurent et al., 2015; Ulitsky, 2016; Jiao et al., 2019).

Los lncRNAs suelen clasificarse en función de la posición que ocupan en relación con los genes cercanos anotados. De esta manera, se puede diferenciar entre lncRNAs que se encuentran situados en regiones intergénicas (*intergenic* lncRNAs) y lncRNAs que solapan con la secuencia de un gen cercano (Rinn y Chang, 2012; Wu et al., 2016). En este último grupo se diferencian, a su vez, lncRNAs cuya secuencia está localizada total o parcialmente dentro de un intrón (*intronic* lncRNAs) y lncRNAs que solapan directamente con la secuencia de un exón (Rinn y Chang, 2012; Wu et al., 2016). En este caso, si el lncRNA se transcribe en la misma dirección que el gen se clasifica como *sense* lncRNA, y si lo hace en la dirección opuesta, se denominaría como *natural antisense* lncRNA (NAT-AS). A veces, la posición que ocupa un lncRNA en el genoma está muy relacionada con la función que realiza. Así, es común que los NAT-AS actúen regulando la expresión de los genes adyacentes (Rinn y Chang, 2012; Wu et al., 2016).

#### 1.2.1. Mecanismos de regulación de la expresión génica mediados por lncRNAs

Los lncRNAs se han destapado como elementos importantes en la regulación de la expresión génica en eucariotas (Rinn y Chang, 2012). Al igual que las proteínas, son capaces de actuar al nivel epigenético, transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional (Djebali et al., 2012; Mattick, 2011). Las funciones que llevan a cabo los lncRNAs dependen, principalmente, de su localización subcelular y de su interacción con proteínas y otros RNAs. Para llevar a cabo estas funciones, los lncRNAs son capaces de

actuar mediante mecanismos en *cis* (actúan cerca de los lugares donde se transcriben) o en *trans* (actúan alejados de los lugares donde se transcriben) (Yao et al., 2019).

#### 1.2.1.1. Mecanismos de regulación epigenética

La cromatina es una estructura dinámica y el grado de compactación de una región concreta influye en los niveles de transcripción de los genes que se encuentran localizados en dicha zona (Hübner y Spector, 2010). El grado de compactación de la cromatina viene determinado por las modificaciones post-traduccionales de las histonas y de las proteínas no histónicas que la constituyen, así como por los niveles de metilación del DNA (Pombo y Dillon, 2015). Muchos lncRNAs han sido implicados en la reorganización de la estructura de la cromatina a través de distintos mecanismos (Lee et al., 2012; Meller et al., 2015). Algunos lncRNAs interaccionan con proteínas pertenecientes a complejos modificadores de histonas, regulando así la deposición de marcas epigenéticas (Lee et al., 2012; Meller et al., 2015). Otros interaccionan con complejos modificadores de proteínas no histonas asociadas a la cromatina, controlando su estado de compactación (Hasegawa et al., 2010; Yamanaka et al., 2015). En cualquier caso, los lncRNAs guían a los complejos modificadores hacia su lugar de actuación interaccionando directamente con el DNA o con proteínas de unión a DNA (Chen et al., 2018). Además, se ha descrito que también pueden actuar secuestrando a los complejos, impidiendo que se unan a la cromatina y lleven a cabo su función (Han et al., 2014). Por otro lado, los lncRNAs pueden participar en el silenciamiento génico mediado por la metilación del DNA, a través de su interacción con reguladores positivos de la metilación lo que provoca un descenso en la actividad de esos reguladores y, por tanto, una disminución en los niveles de metilación (Zhou et al., 2015). En plantas, los lncRNAs también pueden participar en un mecanismo de metilación de DNA mediado por RNA (RdDM). En este caso, lncRNAs transcritos por la polimerasa IV sirven de precursores para la biogénesis de siRNAs de 24 pares de bases, los cuales interaccionan con AGO4 y le dirigen hacia otro lncRNA, esta vez transcrito por la polimerasa V, que ancla la maquinaria de metilación del DNA a sus genes diana para atenuar su expresión (Wierzbicki et al., 2009; Wierzbicki, 2012).

#### 1.2.1.2. Mecanismos de regulación transcripcional

Otro mecanismo a través del cual los lncRNAs pueden regular la expresión génica es reclutando factores de transcripción, o interfiriendo con la maquinaria de la RNA polimerasa II (Yao et al., 2019). Se ha demostrado que lncRNAs situados en la región promotora de ciertos genes pueden regular su expresión interaccionando con el DNA

para reclutar factores de transcripción (Rinn y Chang, 2012). La unión del RNA al DNA de doble cadena genera una estructura de triple hélice llamada *R-loop*, necesaria para el reclutamiento de factores de transcripción por parte de los lncRNAs (Postepska-Igielska et al., 2015; Boque-Sastre et al., 2015).

Los lncRNAs también reprimen la transcripción mediante su interacción con diferentes complejos de la RNA polimerasa II. Ciertos lncRNAs pueden unirse a factores de elongación necesarios para fosforilar la RNA polimerasa II y activar el proceso de elongación del RNA, reprimiendo su actividad kinasa e impidiendo la activación de la RNA polimerasa II y la elongación del RNA (Yang et al., 2001). Finalmente, algunos lncRNAs controlan la expresión de sus genes vecinos bloqueando su transcripción. Así, lncRNAs antisentido que se transcriben a la vez que un gen adyacente pueden interrumpir su transcripción por la colisión co-transcripcional de las polimerasas implicadas (Hobson et al., 2012; Pelechano y Steinmetz, 2013).

#### 1.2.1.3. Mecanismos de regulación post-transcripcional

Los lncRNAs también pueden regular la expresión génica al nivel post-transcripcional, controlando la estabilidad o el *splicing* de los mensajeros. Entre los que regulan la expresión génica controlando la estabilidad de los mensajeros, se encuentran los denominados *endogenous targets mimics* (eTM) en plantas, o *competing endogenous RNAs* (ceRNAs) en animales (Franco-Zorrilla et al., 2007; Salmena et al., 2011). Suelen ser RNAs circulares y se caracterizan por poseer elementos de reconocimiento de miRNAs (MREs) que permiten el secuestro de estos (Hansen et al., 2013). Cuando un determinado miRNA interacciona con el lncRNA se evita la degradación de los mensajeros blancos de ese miRNA, promoviendo su acumulación (Salmena et al., 2011; Kartha y Subramanian, 2014). Otros lncRNAs regulan los niveles de mRNAs secuestrando proteínas implicadas en la deadenilación y el *decapping* de mensajeros, impidiendo su función (Lee et al., 2016; Wickens et al., 2002). Por último, algunos lncRNAs controlan la estabilidad de los mRNAs activando su degradación 5'→ 3' por exonucleasas a través de una vía específica de mamíferos llamada Staufen1 (Park y Maquat, 2013). En lo que respecta a los lncRNAs implicados en la regulación de la expresión génica controlando el *splicing* de pre-mRNAs, se ha descrito que pueden llevar a cabo este control modulando los niveles de fosforilación de factores reguladores de *splicing* (Cooper et al., 2014), o interaccionando directamente con los pre-mRNAs lo que origina cambios en los patrones de *splicing* (Beltran et al., 2008).



#### 1.2.1.4. Mecanismos de regulación traduccional y post-traduccional

La expresión génica está regulada también por lncRNAs a través del control de la traducción o de modificaciones post-traduccionales (Chen et al., 2018; Yao et al., 2019). Los lncRNAs pueden asociarse a ribosomas impidiendo la traducción de proteínas mediante el reclutamiento de factores represores de la traducción (Yoon et al., 2012). Además, ciertos lncRNAs son capaces de unirse a protein kinasas, inhibiendo su actividad y controlando, así, la fosforilación de ciertas proteínas (Liu et al., 2015a).

### 1.3. Los RNAs largos no codificantes en plantas

Pese al auge que ha tenido el estudio de los lncRNAs en animales en los últimos años, en plantas siguen siendo unos grandes desconocidos. Recientemente, se han realizado diferentes análisis transcriptómicos en 39 especies vegetales con el fin de identificar lncRNAs (Szczesniak et al., 2019). Entre ellas, cabe destacar especies como *Zea Mays*, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Glycine Max*, *Medicago truncatula* o *Arabidopsis thaliana* (Li et al., 2014; Shin et al., 2018; Cui et al., 2017; Lee et al., 2017; Hou et al., 2017; Wang et al., 2015; Liu et al., 2012). En *Arabidopsis* se han identificado en torno a 6500 lncRNAs (Liu et al., 2012; Di et al., 2014; Singh et al., 2018) y, aunque de muy pocos de ellos se ha establecido su función, se ha puesto de manifiesto que algunos están implicados en procesos biológicos fundamentales, como el transporte de auxinas, la fotomorfogénesis, la respuesta a patógenos, el *splicing* alternativo, la homeostásis de fosfato, la floración o la respuesta a situaciones de estrés abiótico (Ariel et al., 2014; Wang et al., 2014; Seo et al., 2019; Bardou et al., 2014; Franco-Zorrilla et al., 2007; Wu et al., 2018; Ding et al., 2012; Henriques et al., 2017; Swiezewski et al., 2009; Heo y Sung, 2011; Kim y Sung, 2017; Qin et al., 2017; Kindgren, 2018). En aquellos casos en los que se ha podido determinar el mecanismo de acción, se ha demostrado que, al igual que en animales, los lncRNA de plantas también funcionan regulando la expresión génica a diferentes niveles, incluyendo el epigenético, transcripcional y post-transcripcional.

#### 1.3.1. Mecanismos de regulación epigenética mediados por lncRNAs en plantas

Varios de los lncRNAs que se han descrito en plantas y cuya función ha sido caracterizada participan en el control de la expresión génica al nivel epigenético (Liu et al., 2015b; Nejat y Mantri, 2017). Tres de ellos, *COOLAIR*, *COLD AIR* y *COLDWRAP*, están implicados en la de vernalización, un proceso mediante el cual ciertas plantas aseguran su transición hacia la fase reproductiva tras una exposición prolongada a frío (Nejat y Mantri, 2017; Tian et al., 2019). En concreto, contribuyen a la represión de la

transcripción del gen *FLC*, un represor de la transición floral en el proceso de vernalización (Swiezewski et al., 2009; Heo y Sung, 2011; Kim y Sung, 2017). *COOLAIR* es un lncRNA antisentido situado en el locus de *FLC* que aumenta sus niveles de forma transitoria durante las primeras semanas de vernalización (Liu et al., 2010; Marquardt et al., 2014; Csorba et al., 2014). La expresión de *COOLAIR* promueve un descenso en la metilación de la lisina 36 de la histona H3 (H3K36me3) (modificación post-traducciona normalmente asociada a la activación de la expresión) y un aumento en la metilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) (modificación asociada con la represión de la transcripción) en la zona promotora de *FLC*, ocasionando su silenciamiento durante las primeras semanas de vernalización (Marquardt et al., 2014; Csorba et al., 2014). Posteriormente, se produce la expresión de *COLD AIR* y *COLDWRAP*, que también se transcriben en el locus de *FLC* e interaccionan con el complejo *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2), que se encarga de depositar la marca represora H3K27me3 en la región de *FLC* (Heo y Sung, 2011; Kim y Sung, 2017). La metilación de la cromatina en esta región ocasiona la formación de un *loop* cromatínico que impide la expresión de *FLC*, lo cual es esencial para el correcto desarrollo del proceso de vernalización (Heo y Sung, 2011; Kim y Sung, 2017; Kim et al., 2017). *MAS* es otro lncRNA de *Arabidopsis* implicado en el control de la vernalización. Este lncRNA se induce por frío y regula positivamente la expresión de *MAF4*, un gen que codifica una proteína de la familia de *FLC* cuya función es prevenir la vernalización prematura (Zhao et al., 2018). *MAS* se une a la proteína WDR5a, un componente principal del complejo COMPASS-like, que actúa trimetilando la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3), una marca asociada a la activación transcripcional (Jiang et al., 2011). *MAS* guía este complejo a la región promotora de *MAF4* para activar su transcripción y evitar la floración prematura de *Arabidopsis* (Zhao et al., 2018).

El lncRNA *AG-incRNA4*, por otra parte, controla el desarrollo floral en *Arabidopsis* mediante la represión del gen *AG*, que codifica un regulador clave en el control del desarrollo de estambres y carpelos (Bowman et al., 1991; Wu et al., 2018). *AG-incRNA4* interacciona con CLF, la subunidad catalítica del PRC2, y lo guía hasta la región cromosómica que contiene el gen *AG* promoviendo un aumento en la deposición de la marca H3K27me3 en este locus y, por tanto, su represión (Wu et al., 2018).

Otro lncRNA de plantas implicado en el control epigenético de la expresión génica, es *APOLO*. Este lncRNA es transcrito por las polimerasas II y V, y se encuentra en la región promotora del gen *PID*, un gen regulador del transporte de auxinas en *Arabidopsis* (Friml et al., 2004; Ariel et al., 2014). La expresión de *PID* y *APOLO* es activada por auxinas (Ariel et al., 2014). *APOLO* interacciona con la proteína LHP1 llevándolo hacia la región promotora de *PID* (Ariel et al., 2014). Allí, la interacción de LHP1 con la cromatina favorece la formación de un *loop*, que da lugar a un descenso en

la expresión de *PID* y *APOLO*, permitiendo el correcto desarrollo de la raíz (Ariel et al., 2014).

### 1.3.2. Mecanismos de regulación transcripcional mediados por lncRNAs en plantas

Algunos lncRNAs de *Arabidopsis* funcionan regulando la transcripción de sus genes diana. *ELENA1* es un lncRNA implicado en la activación de la respuesta inmune de *Arabidopsis* (Seo et al., 2019). Su expresión se induce en presencia de los elicitores de la respuesta a patógenos elf18 y flg22, e interacciona con la subunidad 19a del complejo mediador. Esta interacción es necesaria para que el complejo mediador se pueda dirigir a la región promotora del gen *PR1*, que codifica una proteína fundamental para la respuesta inmune, y promueva su expresión (Seo et al., 2019).

Recientemente, se ha caracterizado un lncRNA, llamado *SVK*, implicado en el control del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis* (Kindgren, 2018). *SVK* es un lncRNA antisentido de *CBF1*, cuya expresión se induce posteriormente a la de este gen y detiene su transcripción. Se ha propuesto que *SVK* actuaría regulado negativamente la expresión de *CBF1* mediante un mecanismo de colisión co-transcripcional de la RNA polimerasa II (Kindgren, 2018).

### 1.3.3. Mecanismos de regulación post-transcripcional mediados por lncRNAs en plantas

Los lncRNAs de plantas también son capaces de regular la expresión génica mediante el control del silenciamiento génico por miRNAs y del *splicing* de pre-mRNAs (Franco-Zorrilla et al., 2007; Bardou et al., 2014). El eTM *IPS1* está implicado en la homeostásis de fósforo en *Arabidopsis* (Franco-Zorrilla et al., 2007). En este caso, parte de la secuencia de *IPS1* es parcialmente complementaria a la del miRNA 399, el cual media la degradación del mRNA de *PHO2*, un gen que codifica una proteína implicada en el control de los niveles de fósforo en la parte aérea de la planta (Chiou, 2005). *IPS1* es capaz de secuestrar al miRNA 399 y, en consecuencia, promover un aumento en la estabilidad de los mensajeros de *PHO2*, asegurando así la correcta homeostasis de fósforo (Franco-Zorrilla et al., 2007).

*ASCO-RNA* es un lncRNA de *Arabidopsis* que participa en el control del *splicing* a través de la interacción con una familia de proteínas de unión a RNA llamadas NSRs (Bardou et al., 2014). Se ha propuesto que *ASCO* y los pre-mRNAs competirían por la unión a las NSR para controlar la disponibilidad de estos factores, lo que ocasionaría alteraciones en los patrones de *splicing* de los pre-mRNAs diana (Bardou et al., 2014). Este mecanismo

permite el adecuado desarrollo de raíces laterales en respuesta a auxinas en *Arabidopsis* (Bardou et al., 2014).

#### **1.4. Planteamiento de la tesis, hipótesis de trabajo y objetivos**

Los lncRNAs han emergido recientemente en eucariotas como elementos clave en la regulación de la expresión génica en numerosos procesos biológicos. En plantas, como ha quedado reflejado en esta introducción, el estudio de los lncRNAs está todavía en sus inicios, y su implicación en el control de la respuesta a estreses abióticos ha sido escasamente abordada. Con el objetivo de identificar lncRNAs que pudieran participar en la regulación del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis*, en nuestro laboratorio se llevó a cabo una búsqueda de este tipo de RNAs cuya expresión se indujera o se reprimiera en respuesta a frío. Para ello, analizando experimentos de RNA-seq, se buscaron regiones del genoma de *Arabidopsis* que no contuvieran ningún gen anotado y mostraran alteraciones transcripcionales en condiciones de temperaturas bajas. De este modo, se identificaron 4 regiones que tenían todas las características de lncRNAs, a las que denominamos *REGULATED IN COLD ACCLIMATION (RICA) 1-4*. La expresión de tres de ellas (*RICA1*, *RICA3* y *RICA4*) se inducía a 4°C, mientras que la de *RICA2* se reprimía. En base a estos resultados, planteamos como hipótesis de trabajo para esta Tesis que las regiones *RICA* correspondían a lncRNAs implicados en la regulación del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis*.

Para validar esta hipótesis nos propusimos los siguientes objetivos:

Caracterizar molecularmente *RICA1*, *RICA2*, *RICA3* y *RICA4*.

Caracterizar funcionalmente *RICA1*, *RICA2*, *RICA3* y *RICA4* en la respuesta de *Arabidopsis* a las temperaturas bajas.





## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**





## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento**

En todos los experimentos se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh del ecotipo Columbia (Col-0) como genotipo silvestre. En este trabajo se identificaron las líneas de inserción de T-DNA, *rica1-se* (SALK\_021588), *rica2-1* (SALK\_020756) *rica3-1*, (GK-274D01), *rica4-1* (SALK\_007722) y *rica4-2* (GK-145A05). También se utilizaron plantas *ldl1* (Jiang et al., 2007), *ldl4* (He et al., 2003), *nrpd1* (*nrpd1a-3*) (Onodera et al., 2005), *nrpe1* (*nrpd1b-11*) (Pontes et al., 2006), *ago4-1* (Wierzbicki et al., 2009) y *clf-28* *swn7* (de Lucas et al., 2016). Para el genotipado de los mutantes de inserción se utilizaron oligonucleótidos específicos para los extremos del T-DNA y para la secuencia genómica adyacente (Tabla 1). La ausencia de expresión en estos mutantes se comprobó mediante experimentos de RT-PCR cuantitativa y semicuantitativa, utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen. En todos los casos, los ensayos se llevaron a cabo utilizando plantas con las inserciones de T-DNA en homocigosis. Las líneas transgénicas *RICA4<sub>pro</sub>:RICA4* (*c-rica4-1*) y *RICA3<sub>pro</sub>:RICA3* (*c-rica3-1*) se generaron al introducir el plásmido pMDC99 que contenía las secuencia genómica de *RICA4* junto a 1 Kb de su promotor en plantas mutantes *rica4-1* y la región genómica de *RICA3* unida a 1 Kb de su propio promotor en plantas mutantes *rica3-1*, respectivamente. Las líneas de silenciamiento génico mediado por microRNAs artificiales (amiRNAs) se generaron introduciendo la construcción *pMDC123SB-AtMIR390a-B/c* modificada para generar miRNAs específicos para silenciar la expresión de *RICA1* y *RICA2* en plantas Col-0 (Carbonell et al., 2014). Los oligonucleótidos utilizados para generar estas construcciones se indican en la Tabla 1. Por último, también se utilizaron plantas que sobreexpresaban la proteína GFP (35s:GFP) obtenida por C. Perea-Resa previamente en nuestro laboratorio, plantas *clf50* *clf16* que contenían la construcción *35s:GFP:CLF* (Schubert et al., 2006) cedidas por el laboratorio de J.A Jarillo y líneas *ago4-1* que portaban la construcción *AGO4<sub>pro</sub>:AGO4:GFP* (Ye et al., 2012) cedidas por el laboratorio de Yijun Qi.

Para el cultivo en tierra, las semillas se sembraron en macetas de plástico que contenían una mezcla de turba y vermiculita (3:1) humedecida con agua destilada. Tras la siembra, las macetas se dispusieron en bandejas que se cubrieron con film de plástico transparente para evitar contaminaciones y pérdida de humedad durante la germinación. Posteriormente las semillas se estratificaron en oscuridad a 4°C durante 48h.

Las semillas que se utilizaron para los ensayos *in vitro* se dejaron estratificando en agua destilada a 4°C durante 48h en oscuridad y a continuación, se esterilizaron con una solución de hipoclorito sódico al 5% durante cinco minutos. Posteriormente se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril. Estas semillas se sembraron en placas Petri con medio GM (medio Murashige y Skogg 0,5X, MES 0,5 g/L, sacarosa 1% p/v y pH 5,7)

solidificado con Plantagar 0,9% (p/v) (*Duchefa*). Por último, las placas se sellaron con cinta 3M (*Micropore*). Tanto las plantas sembradas en tierra, como *in vitro*, crecieron en cámaras climáticas a 20°C en condiciones de día largo (16h de luz con un flujo de 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 8h de oscuridad).

## 2.2. Tratamientos experimentales

Los tratamientos para analizar la expresión génica a temperaturas bajas se realizaron usando plantas sembradas en tierra o en placa, crecidas en cámaras climáticas a 20°C en condiciones de día largo durante dos semanas. Posteriormente, las plantas se trasladaron a cámaras climáticas a 4°C bajo un periodo de día largo con un flujo de luz de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El material vegetal se recogió a los tiempos indicados, se congeló en nitrógeno líquido y fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento.

Los análisis de tolerancia a la congelación se realizaron en plantas de dos semanas de edad sembradas en tierra, que crecieron en cámaras climáticas a 20°C en condiciones de día largo durante dos semanas. Para aclimatar las plantas se llevaron a cámaras climáticas a 4°C bajo un fotoperiodo de día largo con un flujo de luz de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 7 días. El tratamiento de congelación se realizó manteniendo las plantas a 4°C durante una hora tras lo que se disminuyó la temperatura (1°C / 30 minutos) hasta alcanzar la temperatura de congelación deseada. Tras 6 horas a esta temperatura, se inició un ascenso hasta los 4°C (1°C / 30 minutos). A continuación, las plantas se llevaron de nuevo a cámaras climáticas a 20°C en condiciones de día largo y tras una semana de recuperación se hizo el recuento de supervivientes. Las plantas utilizadas en los ensayos de tolerancia al estrés hídrico y a la alta salinidad crecieron durante 7 días en placas con medio GM en posición vertical y posteriormente se transfirieron a nuevas placas de GM suplementadas con las concentraciones indicadas de NaCl o sorbitol. La tolerancia se cuantificó tras 7 días como el porcentaje de la longitud de la raíz principal o del peso fresco de las plantas tratadas respecto a plantas crecidas en condiciones control.

## 2.3. Secuenciación de lncRNAs

El análisis de las secuencias de los distintos lncRNAs se llevó a cabo mediante experimentos de *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) de los extremos 5' y 3'. Para ello se empleó el kit *First Choice RLM-RACE* (*Ambion*) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los fragmentos de cDNA amplificados mediante el protocolo 5' o 3' RACE fueron clonados en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector* y posteriormente secuenciados. Los extremos 5' de *RICA1* y *RICA2* no pudieron amplificarse mediante 5'RACE, por lo que se delimitaron mediante varias PCRs en las que se utilizaron diferentes oligonucleótidos

situados aguas arriba de los hipotéticos extremos 5' identificados en las lecturas del RNA-seq para cada lncRNA.

### 2.4. Análisis de la expresión génica

#### 2.4.1 Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa

El RNA total de las muestras se extrajo con el reactivo *NZYol* (*NZYTech*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la extracción de RNA total procedente de silicuas y semillas se empleó el protocolo de extracción descrito por Meng y Feldman, (2010). Los RNAs se trataron con DNasa I (*Roche*) durante 15 minutos a 37°C para eliminar restos de DNA genómico. A continuación, se cuantificó la cantidad total de RNA utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*). El cDNA se sintetizó usando el kit *iScript cDNA Synthesis* (*Bio-Rad*), según las indicaciones del fabricante. Para la cuantificación de cDNA mediante la amplificación de PCR en tiempo real se empleó el kit *SsoFast EvaGreen Supermix* (*Bio-Rad*), en un termociclador iQ2 (*Bio-Rad*) usando oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 1). Los valores de expresión se cuantificaron mediante el método  $\Delta\Delta C_T$  (Livak y Schmittgen, 2001) usando como referencia el gen *AT1G13320* (Czechowski et al., 2005). La cuantificación se llevó a cabo por triplicado usando tres réplicas biológicas independientes.

#### 2.4.2. Análisis de la expresión génica de lncRNAs mediante RT-PCR semicuantitativa

La extracción del RNA total y el tratamiento con DNasa I se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. El cDNA se sintetizó partiendo de 1 µg de RNA utilizando el kit *iScript cDNA Synthesis* (*Bio-Rad*) junto a 2 µmol de un oligonucleótido específico para el lncRNA (Tabla 1). El cDNA se amplificó durante 37 ciclos mediante PCR, utilizando la enzima *Taq DNA Polymerase* (*Roche*) usando oligonucleótidos específicos para *RICA2*. Como control de carga se utilizaron oligonucleótidos que amplificaban el cDNA de la tubulina (Tabla 1).

### 2.5. Localización celular

Para determinar los niveles de transcritos de los lncRNAs en núcleo y citoplasma, se llevó a cabo un fraccionamiento subcelular. Se usaron plantas Col-0 de dos semanas de edad, crecidas en tierra y expuestas a 4°C durante los tiempos indicados. Posteriormente, el material vegetal se recogió y se congeló en nitrógeno líquido y fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento. Para llevar a cabo el fraccionamiento subcelular se

resuspendieron 2 g de material previamente pulverizado, en 6 mL de tampón de Lisis [20 mM Tris-HCl pH 8,4, 25% (v/v) glicerol, 20 mM KCl, 2 mM EDTA, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM sacarosa, 0,8 mM PMSF y 5 mM β-mercaptoetanol] que se filtraron a través de 2 capas de filtro de Miracloth. De esta solución filtrada se guardaron 500 µL como control de la fracción total, y el resto se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se guardó el sobrenadante correspondiente a la fracción citoplásmica, y los núcleos precipitados se lavaron 3 veces con el Tampón NRB+Mg<sub>2</sub> [20 mM Tris-HCl pH 8,4, 25% (v/v) glicerol, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% (v/v) Triton-X100, 0,8 mM PMSF y 5 mM β-mercaptoetanol]. Tras el último lavado se retiró todo el sobrenadante y los núcleos se resuspendieron en 500 µL de *NzyOI* (NZYTech). Para la extracción de RNA de la fracción citoplásmica y de la fracción total se usaron 500 µL a los 500 µL de cada fracción retirada anteriormente. Los RNAs se trataron con DNasa I (*Roche*) a 37°C durante 15 minutos para eliminar restos de DNA genómico. Se cuantificó la cantidad total de RNA utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*). El cDNA se sintetizó usando el kit *iScript Advanced cDNA Synthesis* (*Bio-Rad*), según las indicaciones del fabricante y se amplificó usando el kit *SsoFast EvaGreen Supermix* (*Bio-Rad*), en un termociclador iQ2 (*Bio-Rad*). La expresión de los lncRNAs se normalizó respecto a la media de los ciclos umbrales (C<sub>Ts</sub>) obtenidos en la amplificación del 18sRNA y del U6RNA en cada fracción siguiendo el protocolo descrito previamente por Lin et al., (2015).

## 2.6. Inmunoprecipitación de RNA nuclear *in vivo*

Para los experimentos de inmunoprecipitación nuclear *in vivo* (RIP) se siguió el protocolo descrito por Au et al., (2017). Se empleó material de plantas *35s:GFP*, *35s:GFP:CLF* y *AGO4<sub>pro</sub>:AGO4:GFP* de dos semanas de edad crecidas en tierra, en condiciones control o expuestas a 4°C durante 8h. Para fijar el material, se incubó durante 10 minutos en una solución de tampón fostato salino (PBS) con formaldehído al 1% (v/v) aplicando vacío. A continuación, se incubó de nuevo en condiciones de vacío con una solución de glicina 125 mM durante 5 minutos para detener el proceso de fijación y, por último, el material se lavó 4 veces con agua destilada a 4°C. El material se secó y se congeló en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Diez gramos de material de cada genotipo, se pulverizaron usando nitrógeno líquido y se resuspendieron en 40 mL de tampón de Honda [20 mM Hepes KOH pH 7,4, 0,44 M sacarosa, 1,25% Ficoll, 2,5% Dextran T-40, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% Triton X-100, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1X inhibidor de proteasas *cOmplete™ Mini, EDTA-free* (*Roche*), 8 U/mL de inhibidor de RNasas *Ribolock*, (*Thermo-Scientific*)]. A continuación, se filtró el material resuspendido a través de dos capas de filtro de *Miracloth*. La solución filtrada se centrifugó durante 30 minutos a 4°C a 1000 g para separar la fracción nuclear de la citoplásmica. La fracción nuclear precipitada se lavó

4 veces con el tampón de lavado de núcleos (20 mM Hepes KOH pH 7,4, 0,44 M sacarosa, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1X inhibidor de proteasas y 8 u/mL de inhibidor de RNasas). Posteriormente los núcleos ya lavados, se resuspendieron en la solución de lisado de núcleos (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 1% SDS, 1 mM PMSF, 1X inhibidor de proteasas, 160 U/mL de inhibidor de RNasas y 25 µM del inhibidor del proteasoma MG132) y se incubaron durante 30 minutos en hielo con el objetivo de romper los núcleos. A continuación, para fragmentar la cromatina, las muestras lisadas se sonicaron 7 veces durante 15 segundos, a potencia media, manteniendo los tubos en hielo durante 30 segundos entre cada sonicación (*Sonifier® 150D, Branson*). Las muestras sonicadas se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C a 12000 g. El sobrenadante se diluyó 10 veces con el tampón de dilución (16,7 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,1% Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 20 U/mL, 1X inhibidor de proteasas, inhibidor RNasas y 25 µM de MG132) para disminuir la concentración de SDS. Con el fin de disminuir las interacciones inespecíficas se añadieron al sobrenadante 50 µL de microesferas de agarosa (*Pierce™ Control Agarose Resin, Thermo Scientific*), que previamente habían sido lavadas 3 veces con el tampón de lavado de microesferas (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS y 1 mM PMSF) y se incubó durante 2h a 4°C en agitación. Después se recuperó el sobrenadante y traspasó a tubos con otros 50 µL de microesferas de agarosa (previamente lavadas) y se incubó de nuevo en las mismas condiciones durante otras 2 horas. Pasado este tiempo el sobrenadante se traspasó a tubos con 20 µL de microesferas de agarosa unidas covalentemente a GFP (*GFP-Trap, Chromotek*), lavadas previamente 3 veces con el tampón de lavado de microesferas suplementado con 40 U/mL de inhibidor de RNasas. La inmunoprecipitación se realizó O/N a 4°C en agitación, y después se lavaron 3 veces con el tampón de lavado de microesferas suplementado con 40 U/mL de inhibidor de RNasas y 5 U/mL de DNasa I. Para separar el RNA de los inmunocomplejos, las microesferas se incubaron con el tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% SDS y 40 U/mL de inhibidor de RNasas) durante una hora a 65°C en presencia de 20 µg de proteinasa K (*Sigma*). Por último, el RNA se extrajo con NzyOI siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit *iScript® Advanced cDNA Synthesis (Bio-Rad)* y posteriormente se cuantificó mediante qPCR usando oligonucleótidos específicos para cada lncRNA (Tabla 1). Los niveles de *RICA3* y *RICA4* purificado en muestras de plantas transgénicas que expresaban la construcción 35s:GFP, se utilizaron como controles negativos para determinar la inespecificidad de la interacción de ambos lncRNAs con las proteínas AGO4-GFP y GFP-CLF, respectivamente. Los niveles de *RICA3* y *RICA4* que habían sido inmunoprecipitados en extractos de plantas *AGO4<sub>pro</sub>:AGO4:GFP* y *35s:GFP:CLF*, respectivamente fueron corregidos respecto a sus niveles correspondientes en plantas 35s:GFP. En este experimento se utilizaron tres réplicas biológicas independientes.

## 2.7. Inmunoprecipitación de cromatina

Para los experimentos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se siguió el protocolo descrito por B. Desvoves, et al. (2018). En este protocolo se utilizaron plantas Col-0 y mutantes *rica4-1* de dos semanas de edad crecidas en tierra y expuestas a 4°C durante 8h. El material se recogió y se fijó con formaldehído al 1% en las mismas condiciones que en el protocolo de RIP. Para este protocolo se partió de 1 g de material vegetal que se pulverizó y se resuspendió en 10 mL de tampón de extracción [10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,25 M sacarosa, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF y 1X inhibidor de proteasas (*cOmplete™ Mini, EDTA-free, Roche*)]. La suspensión obtenida se incubó durante 30 minutos en agitación a 4°C. A continuación, se filtró a través de 2 capas de filtro de Miracloth y se centrifugó durante 20 minutos, a 4°C y 3000 g. El precipitado nuclear se resuspendió en 4 mL de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF y 1X inhibidor de proteasas) y una vez resuspendido se le añadió SDS hasta una concentración final del 1%. La solución se incubó durante 15 minutos a 4°C en agitación con el objetivo de romper los núcleos celulares. Con el fin de fragmentar la cromatina, la solución de núcleos lisados se sonicó 10 veces durante 20 segundos a intensidad media empleando un sonicador *Sonifier® 150D*, manteniendo los tubos en hielo durante 30 segundos entre cada sonicación. En este protocolo es necesario que el tamaño de los fragmentos de cromatina sea de entre 100 y 500 pares de bases. Para comprobar la eficiencia del proceso de sonicación, se separó la cromatina soluble de la insoluble centrifugando la solución sonicada durante 5 minutos a 4°C a 19000 g. El sobrenadante con la cromatina soluble se llevó a tubos nuevos que se guardaron a 4°C. Para comprobar el tamaño de los fragmentos de cromatina tras la sonicación se realizó una extracción de DNA de la cromatina soluble. Se partió de 60 µL a la que se le añadió agua hasta alcanzar los 200 µL de volumen final. Posteriormente, para romper las uniones covalentes generadas en el paso de fijación con formaldehído, se le añadió 8 µL de NaCl 5 M y se incubó a 65°C en agitación fuerte O/N. A continuación, se digirió el RNA incubando la muestra con 8 µg de RNasa A (*Sigma*) y 8 µL de 1 M Tris-HCl pH 6,8 durante 1h a 37°C en agitación. A continuación, para eliminar las proteínas, se añadieron 20 µg de proteinasa K (*Sigma*), 4 µL de EDTA 0,5 M y se incubó durante 2h más a 37°C en agitación. Para extraer el DNA, se añadió un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó 5 minutos a 19000 g. El sobrenadante se llevó a tubos nuevos y el DNA se precipitó añadiendo 20 µg de Glycoblue, 0,1 volúmenes de 3 M CH<sub>3</sub>COONa pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Las muestras se incubaron 1h a -80°C y después se centrifugaron durante 30 minutos a 19000 g y 4°C. El DNA precipitado se lavó con etanol al 70%. Finalmente, los DNAs se resuspendieron en 30 µL de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0). Para analizar el tamaño de los fragmentos de la cromatina sonicada, se cargaron 20 µL del DNA extraído en un gel de agarosa al 1,5%. Tras comprobar que los fragmentos tenían entre 100 y 500 pb se

procedió a la inmunoprecipitación de la cromatina de las muestras sonicadas, previamente guardadas. En primer lugar, se diluyó la cromatina soluble diez veces con el tampón de dilución (16,7 mM Tris-HCl pH 8,0, 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF y 1X inhibidor de proteasas). Posteriormente, para cada genotipo se separaron 100 µL de cromatina diluida para guardar como *input* y un tubo con 1 mL de cromatina diluida para cada inmunoprecipitación. Así, a unos tubos se les añadió 1 µL de anticuerpo anti IgG como control negativo (Ab6703, *Abcam*) y a otros 5 µL de anticuerpo anti H3K27me3 (Ab6002, *Abcam*) y se dejaron incubando O/N a 4°C en agitación. Para recuperar la cromatina inmunoprecipitada, a cada tubo se le añadieron 50 µL de microesferas magnéticas unidas covalentemente a la proteína G (*Dynabeads™ Protein G, Invitrogen*) (previamente lavadas 2 veces con el tampón de dilución) y se incubaron 2h a 4°C en agitación. Las microesferas magnéticas se decantaron usando una gradilla magnética para retirar el sobrenadante. A continuación, se realizaron dos lavados de las microesferas con cada uno de los siguientes tampones: tampón con baja concentración de sal (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, Triton X-100, 1 mM PMSF y 1X inhibidor de proteasas), tampón con alta concentración de sal (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 0,1% SDS, Triton X-100, 1 mM PMSF y 1X inhibidor de proteasas), tampón con LiCl (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,25 M LiCl, 1% Igepal CA-630, 1% deoxicolato de sodio, 1 mM PMSF y 1X inhibidor de proteasas) y tampón TE. Para eliminar los inmunocomplejos se añadió a cada tubo 200 µL del tampón de elución preparado en fresco (1% SDS y 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>) a 65°C y se incubaron durante 15 minutos a 65°C en agitación vigorosa. Tras esto, se guardó el sobrenadante y se repitió de nuevo la elución obteniendo un volumen final de 400 µL. A continuación, se diluyeron las muestras de los *inputs* hasta un volumen final de 400 µL usando el mismo tampón de elución. Para eliminar las uniones covalentes entre moléculas ocasionadas por la fijación con el formaldehído, a la cromatina inmunoprecipitada se le añadió 16 µL de NaCl 5M y se incubaron a 65°C en agitación O/N. Posteriormente, se volvieron a incuban con 16 µg de RNasa A y 16 µL de 1 M Tris-HC pH 6,8 durante 1h a 37°C en agitación. Por último, se añadieron 8 µg de proteinasa K y 8 µL de EDTA 0,5 M y se incubó durante 2h más a 37°C en agitación. Para la extracción del DNA de las muestras se utilizó el mismo protocolo que el descrito previamente en la comprobación del tamaño de los fragmentos sonicados. En este caso, los DNAs precipitados se diluyeron en 100 µL de TE. Para poder cuantificar por qPCR la cantidad de DNA, se analizaron los niveles acumulación de diferentes regiones del DNA genómico en cada una de las muestras inmunoprecipitadas. Las parejas de oligonucleótidos utilizada en la cuantificación se reflejan en la Tabla 1. Los niveles de DNA inmunoprecipitados fueron relativizados respecto al porcentaje de *input*.

## **2.8. Programas informáticos y análisis estadísticos**

Para el análisis de secuencias, así como para el diseño de oligonucleótidos, se utilizó el programa Geneious (Biomatters Ltd., NZ). Para el análisis de imágenes se empleó el software *ImageJ* (*National Institutes of Health*, EE. UU) y para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa informático Prism6 (GraphPad Software Inc. EE.UU). Para comparar los valores promedio pertenecientes a dos grupos de muestras independientes se realizó una prueba de T de Student de una cola.







### **3. RESULTADOS**

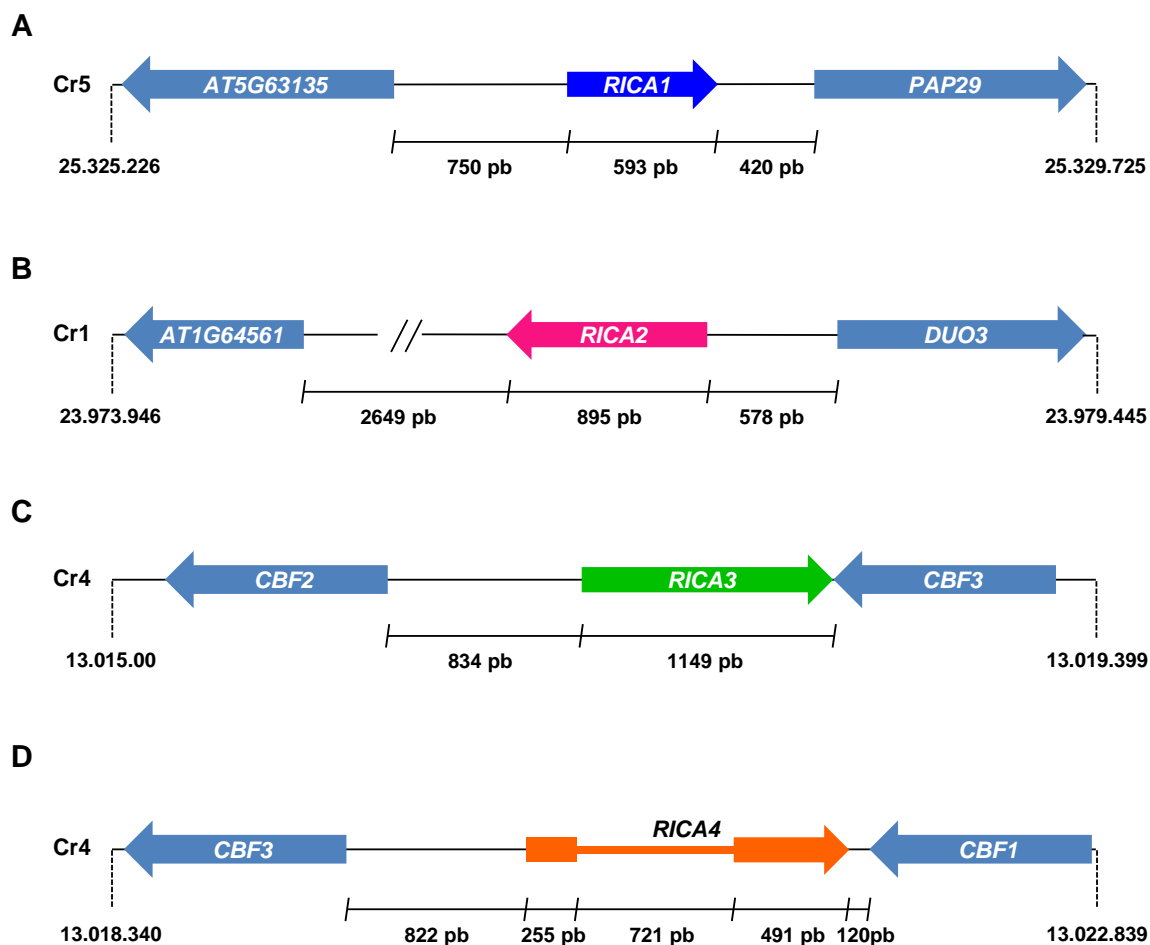


### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Identificación y caracterización molecular de RNAs largos no codificantes de Arabidopsis implicados en la respuesta a temperaturas bajas**

Con el fin de identificar lncRNAs que pudieran participar en la regulación del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis, se analizaron los resultados de distintos experimentos de RNA-seq disponibles en el laboratorio obtenidos a partir de plantas de dos semanas de edad crecidas a 20°C o expuestas a 4°C durante 24h. Se buscaron zonas transcripcionalmente activas, que no contuvieran ningún gen anotado y que mostraran variaciones en sus niveles de expresión en respuesta a las temperaturas bajas. De esta manera, se identificaron cuatro regiones denominadas *RICA1-4*, que en todos los experimentos cumplían los requisitos buscados y podrían corresponder a lncRNAs regulados por frío. La expresión de tres de ellos, *RICA1*, 3 y 4, aumentaba a 4°C mientras que la de *RICA2*, se reprimía

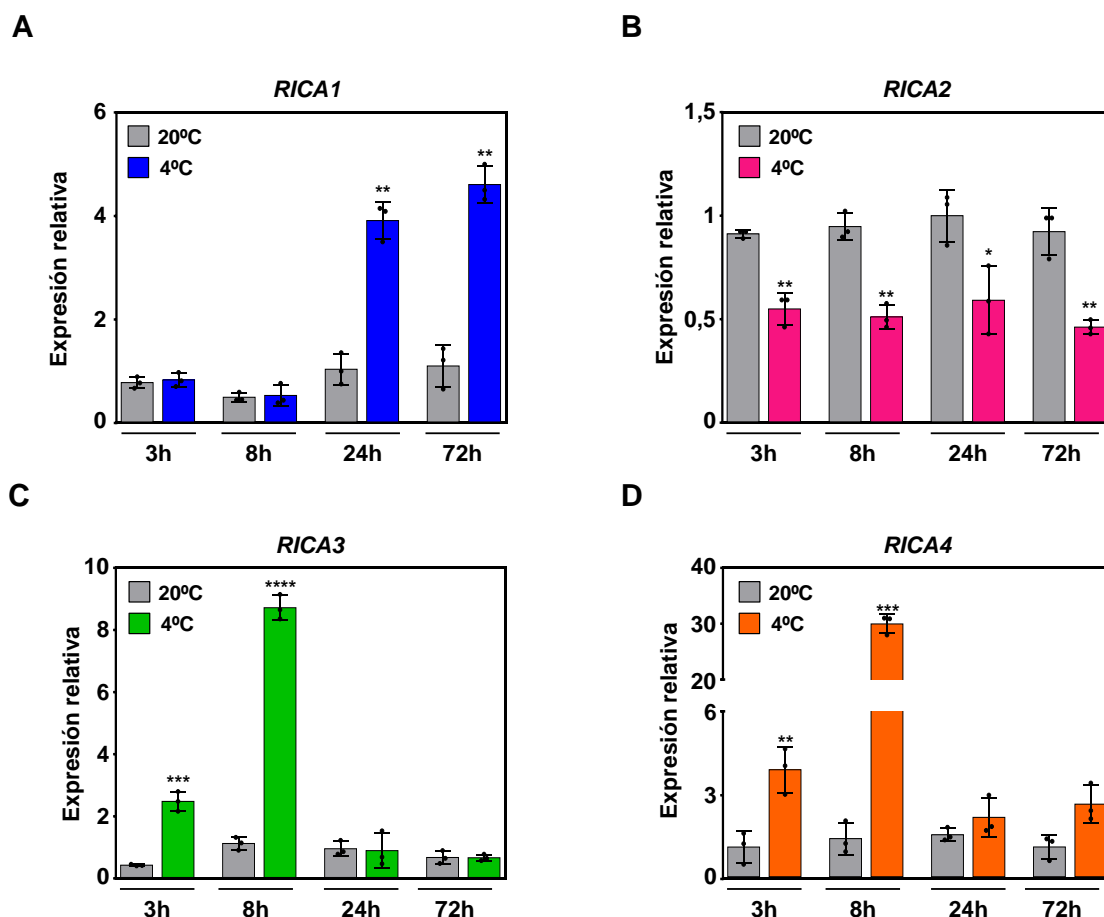
La secuencia completa de cada uno de los lncRNAs se obtuvo mediante experimentos de 5' y 3' RACE. Así, se pudo determinar que *RICA1* se sitúa en el cromosoma 5 de Arabidopsis, en la región intergénica delimitada por los genes *AT5G63135* y *PAP29* (Figura 2A). En este caso, el extremo 5' no pudo determinarse por 5'RACE lo que sugería que los transcritos de *RICA1* no disponían de 5'CAP. Con el fin de determinar su sitio de iniciación de la transcripción, se llevaron a cabo PCRs con diferentes oligonucleótidos situados aguas arriba del hipotético extremo 5' identificado en las lecturas de los experimentos de RNA-seq. El extremo 3' de *RICA1*, que no contenía cola de poliadenina, se determinó añadiendo artificialmente una cola de poliadenina a sus correspondientes transcritos y empleando un oligodT se procedió a su secuenciación. Finalmente, se pudo determinar que *RICA1* tenía una longitud de 593 pb, sin 5'CAP ni cola de poliadenina (Figura 2A). *RICA2*, se localiza en el cromosoma 1, entre el gen *AT1G64561* y *DUO3*. Su longitud es de 895 pb y, al igual que *RICA1*, no posee 5'CAP ni cola de poliadenina (Figura 2B). *RICA3* está situado entre los genes *CBF2* y *CBF3*, el cromosoma 4. Sus transcritos tienen una longitud de 1149 pb y cuentan con 5'CAP y cola de poliadenina (Figura 2C). *RICA4* tiene una longitud de 1438 pb y está constituido por 2 exones. Se sitúa entre los genes *CBF3* y *CBF1*, también en el cromosoma 4 de Arabidopsis, y sus transcritos son de 746 pb con 5'CAP y cola de poliadenina (Figura 2D). El análisis de la secuencia de los transcritos *RICA* corroboró que todos ellos poseían las características propias de los lncRNAs, es decir, una longitud mayor de 200 pb y no contenían ORFs mayores de 100 aminoácidos.



**Figura 2. Localización de los lncRNAs *RICA1-4* en el genoma de *Arabidopsis*.**

(A-D) Representación esquemática de la región genómica de *RICA1* en azul oscuro (A) *RICA2* en magenta (B), *RICA3* en verde (C) y *RICA4* en naranja (D). Se representan los genes que los flanquean en color azul y se indican las coordenadas en las que se localizan cada uno de los lncRNAs en los distintos cromosomas de *Arabidopsis*. También se indican las distancias, en pares de bases (pb), que separan los lncRNAs de sus genes adyacentes, así como su tamaño y el tamaño de los exones (líneas gruesas) e intrones (líneas finas). Las flechas indican la dirección de la transcripción. Cr (Cromosoma).

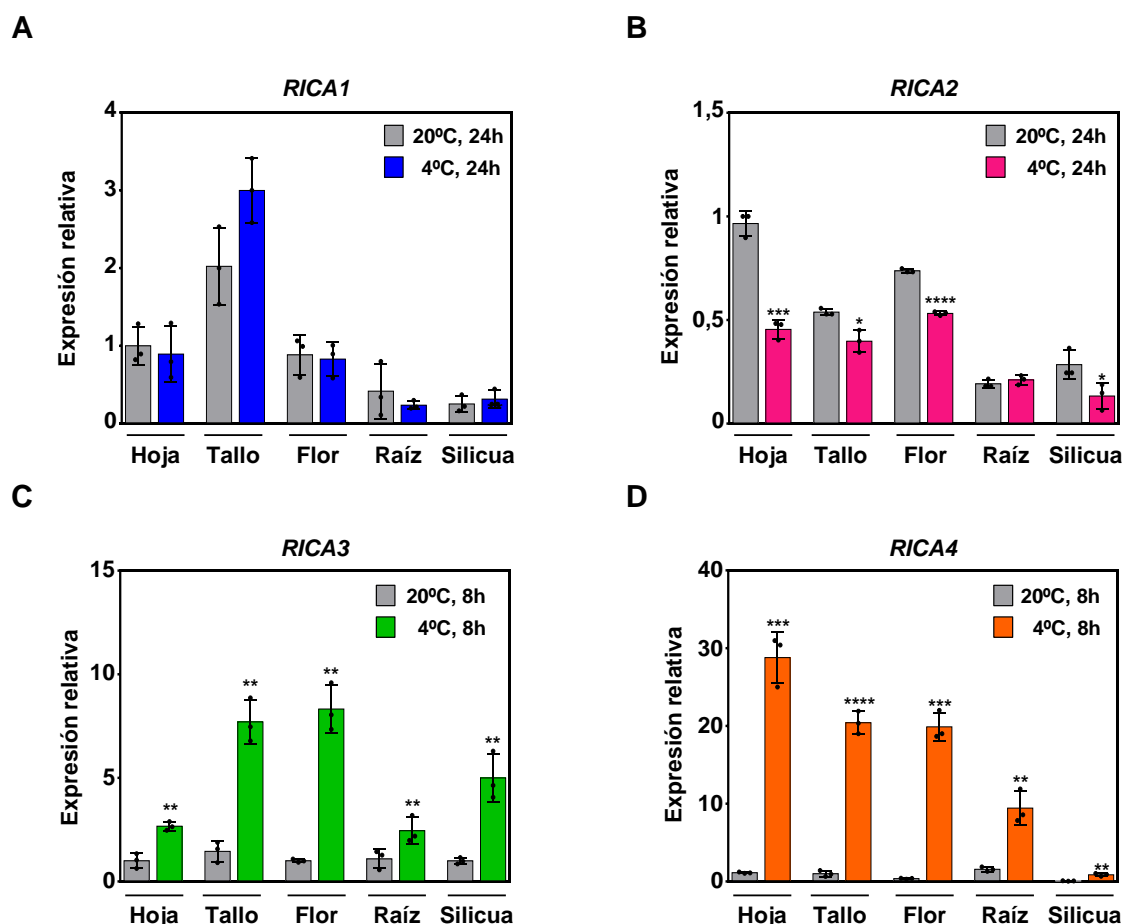
Para corroborar los datos de expresión de los experimentos de RNA-seq, se analizó, mediante experimentos de qPCR, el patrón de expresión de los lncRNAs *RICA1-4* en muestras de plantas Col-0 de dos semanas de edad crecidas en condiciones control y expuestas durante diferentes tiempos a 4°C. A 20°C, todos los lncRNAs presentaban unos niveles basales de transcritos que no variaban significativamente a lo largo de los distintos tiempos estudiados (Figura 3). Los niveles de *RICA1*, *RICA3* y *RICA4* sin embargo, aumentaban significativamente en respuesta a temperaturas bajas, siendo el máximo de expresión de *RICA1* a las 72h (Figura 3A) y el de *RICA3* y *RICA4* a las 8h (Figuras 3C y D). Los niveles de *RICA2*, por el contrario, disminuían tras 3h a 4°C, manteniéndose más bajos que en condiciones control a lo largo del tiempo (Figura 3B). Estos patrones de expresión, por tanto, confirmaban los datos obtenidos previamente por RNA-seq. Posteriormente, se cuantificaron los niveles de los lncRNAs en diferentes órganos de plantas Col-0 de seis semanas de edad en condiciones control o expuestas



**Figura 3. Patrones de expresión de *RICA1-4* en respuesta a temperaturas bajas.**

(A-D) Análisis de la expresión de *RICA1* (A) *RICA2* (B), *RICA3* (C) y *RICA4* (D) en plantas Col-0 de dos semanas de edad crecidas en condiciones control o expuestas a 4°C durante diferentes tiempos. Los niveles de expresión están relativizados respecto a los niveles del control a tiempo 0h. Los asteriscos indican diferencias significativas (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ ) entre los controles y las plantas tratadas con frío, calculadas mediante una prueba de T de Student. Los niveles de transcritos se cuantificaron mediante qPCR. Los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error representan la desviación estándar.

durante 24 (*RICA1* y 2) o 8h (*RICA3* y 4) a 4°C. Sorprendentemente, la expresión de *RICA1* no mostró cambios significativos en respuesta a frío en ninguno de los órganos analizados. (Figura 4A), lo que sugiere que la inducción por frío de *RICA1* es dependiente del estado de desarrollo de la planta. La expresión de *RICA2*, por otra parte, decrecía a 4°C en hoja, tallo, flor y silicuas, pero no en raíces (Figura 4B), mientras que la expresión de *RICA3* y *RICA4* aumentaba significativamente en respuesta a frío en todos los órganos (Figuras 4C y D).



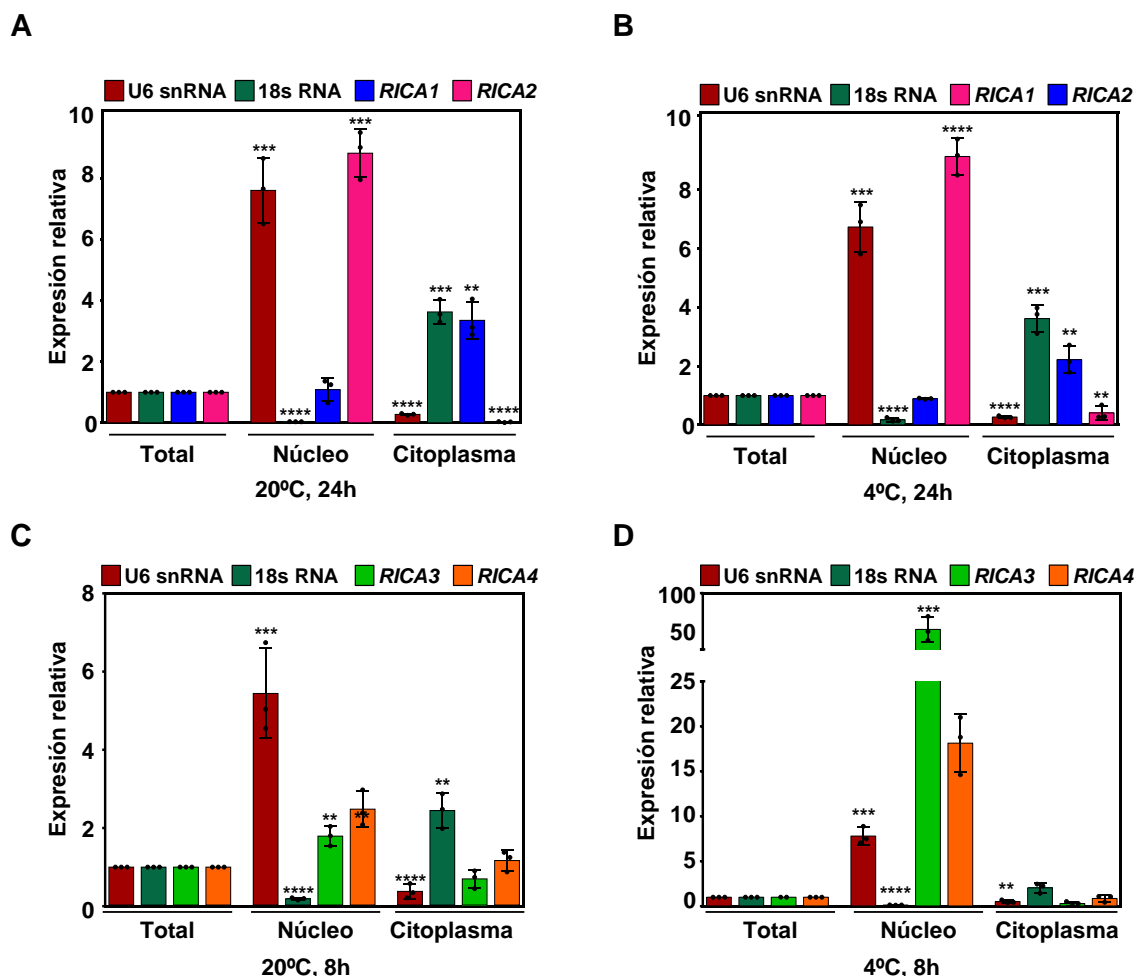
**Figura 4. Expresión de *RICA1-4* en respuesta a temperaturas bajas en distintos órganos de *Arabidopsis*.**

(A-D) Análisis de la expresión de *RICA1* (A), *RICA2* (B), *RICA3* (C) y *RICA4* (D) en diferentes órganos de plantas Col-0 de 6 semanas de edad crecidas en condiciones control o expuestas durante 24h (*RICA1* y *RICA2*) o 8h (*RICA3* y *RICA4*) o a 4°C. Los niveles de expresión están relativizados respecto a los niveles del control en hojas. Los asteriscos indican diferencias significativas (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ ) entre los controles y las plantas tratadas con frío, calculadas mediante una prueba de T de Student. Los niveles de transcritos se cuantificaron mediante qPCR. Los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error representan la desviación estándar.

La localización subcelular de todos los *RICAs*, se llevó a cabo mediante qPCR a partir de RNAs aislados, específicamente, de citoplasmas y núcleos de plantas Col-0 de dos semanas de edad crecidas en condiciones control o expuestas durante 24 (*RICA3* y 4) o 8h (*RICA1* y 2) a 4°C. La Figura 5 muestra un enriquecimiento de *RICA2*, *RICA3* y *RICA4* en la fracción nuclear, tanto en condiciones control como de frío, mientras que *RICA1* aparecía enriquecido en la fracción citoplásmica.

Todos estos resultados demostraban que *RICA1*, *RICA3* y *RICA4* son lncRNAs cuyos niveles de expresión aumentan en respuesta a las temperaturas bajas. Mientras que *RICA3* y *RICA4* están localizados en el núcleo, *RICA1* lo está en el citoplasma. *RICA2*, por el contrario, es un lncRNA nuclear cuyos niveles disminuyen en condiciones de frío.



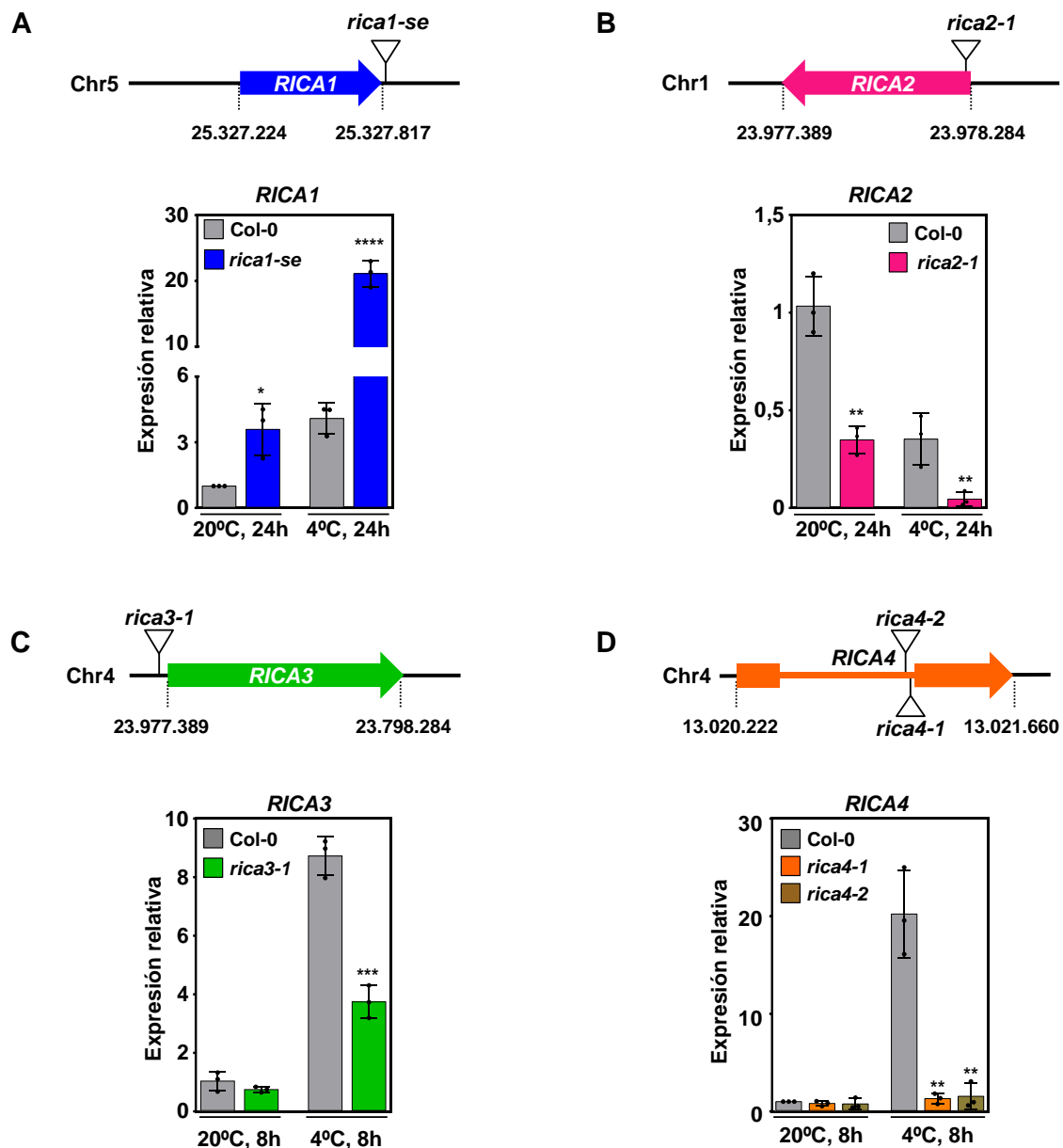


**Figura 5. Localización subcelular de *RICA1-4*.**

(A-D) Análisis de la expresión de *RICA1-4* en las fracciones totales, nucleares y citoplásmicas de plantas Col-0 de dos semanas de edad crecidas en condiciones control o expuestas durante 24h (*RICA1* y 2) (A y B) o 8h (*RICA3* y 4) (C y D) a 4°C. Se cuantificaron los niveles de U6snRNA como control de la fracción nuclear y de 18sRNA como control de la fracción citoplásmica. En todos los casos los niveles de expresión en núcleo y citoplasma se relativizan respecto a los niveles presentes en la fracción total. Los asteriscos indican diferencias significativas (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,005$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ ) entre la fracción total y la fracción nuclear o citoplásmica calculadas mediante una prueba de T de Student. Los niveles de transcritos se cuantificaron mediante qPCR. Los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error muestran la desviación estándar.

### 3.2. Identificación de mutantes para los RNAs largos no codificantes *RICA1-4*

Con objeto de caracterizar funcionalmente los lncRNAs *RICA1-4*, se llevó a cabo una búsqueda de mutantes en las colecciones públicas de líneas de T-DNA de Arabidopsis. Se identificaron varias líneas que contenían el T-DNA insertado en diferentes regiones de los *RICAs*. En concreto, se identificó una línea que poseía una inserción localizada aguas abajo de *RICA1* (SALK\_021588) (Figura 6A), una línea (SALK\_020756) cuyo T-DNA estaba dentro de la región genómica 5' de *RICA2* (Figura 6B), la línea GK-274D01, en la que el T-DNA se localizaba en el promotor de *RICA3* (Figura 6C), y dos líneas, SALK\_007722 y *rica4-2* GK-145A05, que presentaban la inserción dentro del intrón de

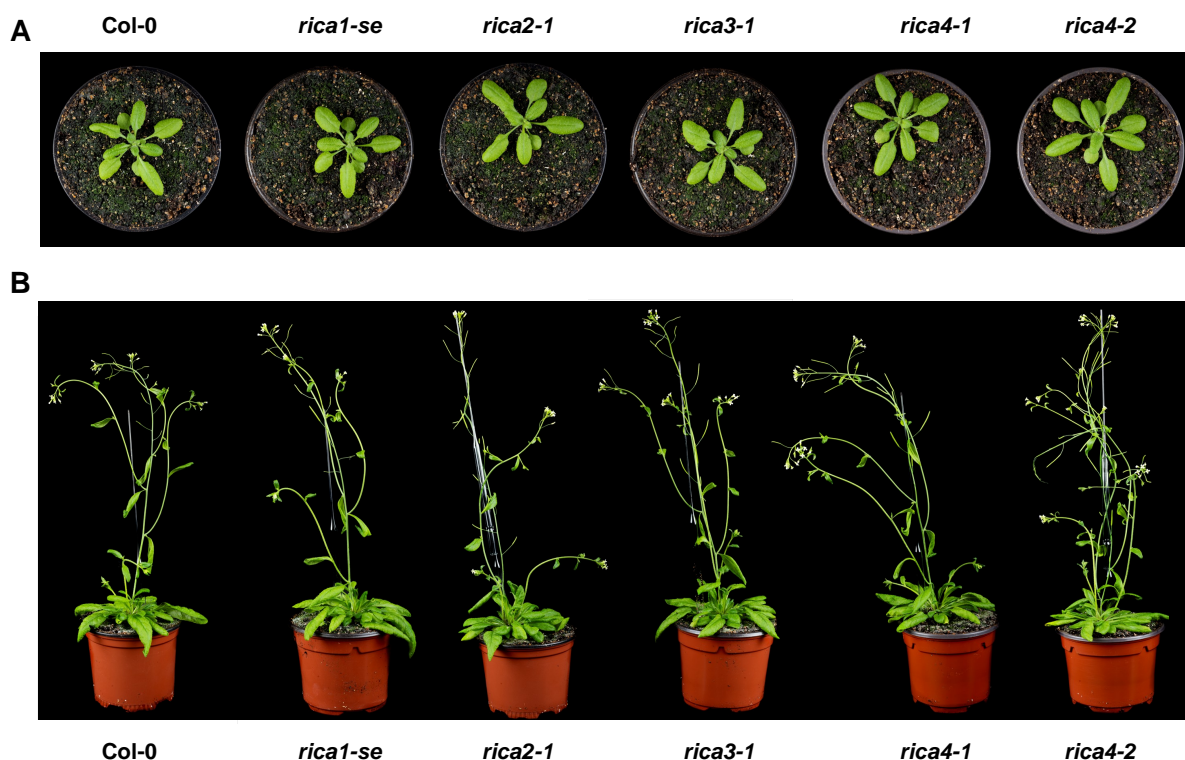


**Figura 6. Identificación y caracterización de mutantes para los lncRNAs *RICA1-4*.**

**(A-D, paneles superiores)** Esquemas representativos de las localizaciones de la inserciones de T-DNA en la regiones genómicas de *RICA1* en plantas *rica1-se* **(A)** de de *RICA2* en plantas *rica2-1* **(B)**, de *RICA3* en plantas *rica3-1* **(C)** y de *RICA4* en plantas *rica4-1* y *rica4-2* **(D)**. En cada caso se indican las coordenadas que delimitan los genes correspondientes a cada lncRNA. **(A-D, paneles inferiores)** Niveles de expresión de los diferentes lncRNAs en plantas Col-0, *rica1-se* **(A)**, *rica2-1* **(B)**, *rica3-1* **(C)** y *rica4-1* y *rica4-2* **(D)** de dos semanas de edad crecidas a 20°C y expuestas durante 24 (*RICA1* y *RICA2*) y 8h (*RICA3* y *RICA4*) a 4°C. Los niveles de transcritos de los mutantes se analizaron mediante experimentos de qPCR y se relativizaron a los niveles de plantas Col-0 crecidas en condiciones control. Los asteriscos indican diferencias significativas (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ ) entre las plantas Col-0 y los mutantes, calculadas mediante una prueba de T de Student. Los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media y las barras de error representan la desviación estándar.

*RICA4* (Figura 6D). Para determinar cómo afectaban las inserciones de T-DNA a la expresión de los correspondiente lncRNAs en estas líneas, se realizaron experimentos de qPCR con muestras de plantas Col-0 y de plantas homocigotas de cada una de las líneas, crecidas en condiciones control o expuestas a 4°C durante 24 (*RICA1* y 2) o 8h

(*RICA3* y 4). Los resultados obtenidos revelaron que la línea en la que el T-DNA estaba insertado en la zona 3' de *RICA1* tenía niveles elevados de *RICA1*, por lo que se denominó *rica1 sobreexpresora* (*rica1-se*) (Figura 6A). Las líneas en las que el T-DNA se localizaba en *RICA2* y *RICA3*, mostraban una reducción significativa en los niveles de expresión de los correspondientes lncRNAs y se denominaron *rica2-1* y *rica3-1*, respectivamente (Figura 6B y C). Por su parte, las líneas que contenían los T-DNAs en *RICA4* eran nulas o altamente hipomórficas para la expresión del lncRNA por lo que se denominaron *rica4-1* y *rica4-2* (Figura 6D). Hay que destacar que las líneas de T-DNA encontradas en ningún caso mostraban alteraciones significativas en su desarrollo en comparación con las plantas de genotipo silvestre (Figura 7).



**Figura 7. Los mutantes para los lncRNAs no presentan alteraciones en sus patrones de desarrollo.**

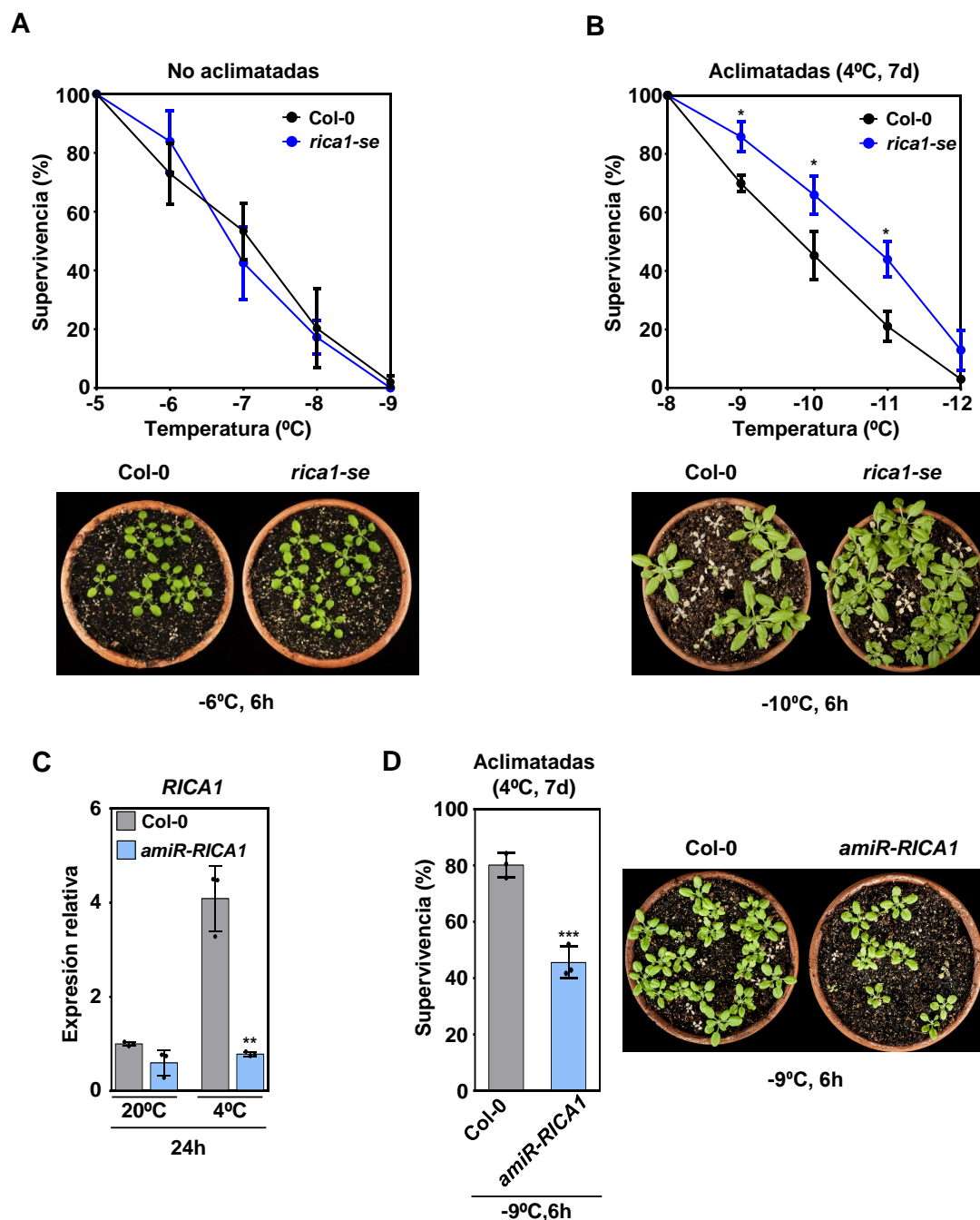
**(A-B)** Imágenes representativas de plantas *rica1-se*, *rica2-1*, *rica3-1*, *rica4-1* y *rica4-2*. Roseta de plantas de 4 semanas **(A)** y plantas de 6 semanas **(B)**.

### 3.3. Caracterización funcional de *RICA1*

#### 3.3.1. *RICA1* regula positivamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis*

Para determinar la función de *RICA1* en la respuesta de *Arabidopsis* a las temperaturas bajas, se analizó la tolerancia constitutiva a las heladas y la capacidad de aclimatar de plantas Col-0 y *rica1-se*. Plantas de dos semanas de edad, no aclimatadas o aclimatadas a 4°C durante 7 días, se sometieron a diferentes temperaturas de congelación durante 6h. La tolerancia de cada genotipo se cuantificó como el porcentaje de plantas supervivientes a los tratamientos tras 7 días de recuperación a 20°C. Este análisis reveló que no existían diferencias significativas entre la supervivencia de las plantas *rica1-se* y las plantas Col-0, presentando ambas una  $LT_{50}$  (temperatura a la que la mortalidad es del 50%) en torno a -7°C (Figura 8A). Sin embargo, las plantas *rica1-se* presentaban una capacidad para aclimatar significativamente mayor ( $LT_{50} \approx -10,8^{\circ}\text{C}$ ) que las plantas Col-0 ( $LT_{50} \approx -10^{\circ}\text{C}$ ) (Figura 8B). Estos resultados sugerían que *RICA1* no está implicado en la tolerancia constitutiva de *Arabidopsis* a las heladas, pero regula positivamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. Con el fin de corroborar estos datos, se generaron líneas amiRNAs (Carbonell et al., 2014) De este modo, se obtuvo una línea *35s:amiRNA:RICA1* (*amiR-RICA1*), que silenciaba de manera significativa la expresión de *RICA1* en condiciones de frío (Figura 8C). El análisis de estas plantas mostró que, contrariamente a las plantas *rica1-se*, tenían una menor capacidad para aclimatar que la de las plantas silvestres (Figura 8D). Estos resultados confirmaron que *RICA1* actúa como regulador positivo del proceso de aclimatación en *Arabidopsis*.

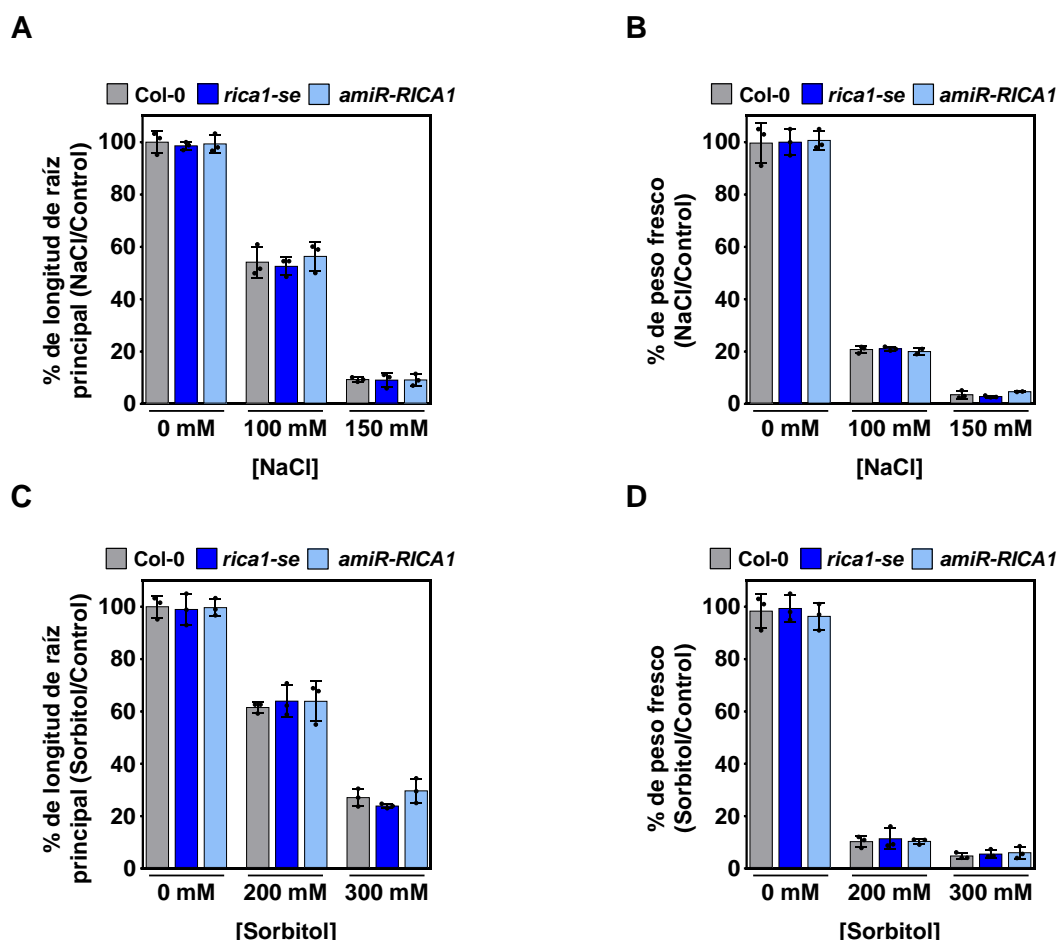
En plantas, la respuesta al estrés producido por las temperaturas bajas está íntimamente relacionado con la respuesta al estrés salino e hídrico. De hecho, algunos mecanismos de estas respuestas son comunes (Thomashow, 1999). Para evaluar si, además de regular la respuesta de aclimatación, *RICA1* también participaba en la regulación de la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés salino y a la sequía, se cuantificó la tolerancia de las plantas *rica1-se* y de las líneas *amiR-RICA1* a altas concentraciones de NaCl y de sorbitol. La tolerancia se evaluó transfiriendo plantas de 7 días de edad, crecidas en medio GM a 20°C, a un nuevo medio suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (0, 100 y 150 mM) o sorbitol (0, 200 y 300 mM). Tras una semana creciendo en estas condiciones, las tolerancias se cuantificaron comparando la longitud de la raíz principal y el peso fresco de las plantas mutantes respecto a las de genotipo silvestre. La Figura 9 muestra que no se encontraron diferencias significativas, en ningún caso, entre las plantas Col-0 y los mutantes *rica1-se* y *amiR-RICA1*. Estos resultados indicaban que *RICA1*



**Figura 8. *RICA1* regula positivamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis*.**

(A-B, paneles superiores) Porcentaje de supervivencia de plantas Col-0 y *rica1-se* dos semanas de edad, sin aclimatar (A) y aclimatadas durante una semana a 4°C (B), sometidas a las temperaturas indicadas durante 6h. (A-B, paneles inferiores) Imágenes representativas de plantas no aclimatadas (A) y aclimatadas durante 7 días a 4°C (B), congeladas a las temperaturas indicadas durante 6h tras una semana de recuperación. En (A) y (B) los puntos representan la media de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. (C) Cuantificación de los niveles de *RICA1* en plantas Col-0 y *amiR-RICA1* de dos semanas de edad crecidas a 20°C y expuestas a 4°C durante 24h. (D, panel izquierdo) Porcentaje de supervivencia de plantas Col-0 y *amiR-RICA1* de dos semanas de edad aclimatadas durante una semana a 4°C y expuestas a -9°C durante 6h. (D, panel derecho) Imagen representativa de plantas Col-0 y *amiR-RICA1* aclimatadas durante una semana a 4°C y posteriormente congeladas a -9°C durante 6h, tras 7 días de recuperación. En (C) y (D) los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error representan la desviación estándar. En todos los casos los asteriscos indican diferencias significativas (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ) entre plantas Col-0 y *rica1-se* o *amiR-RICA1*, calculadas mediante una prueba de T de Student.

no participa en la regulación de la tolerancia de Arabidopsis al estrés salino ni al hídrico, siendo su función, por tanto, específica del proceso de aclimatación.



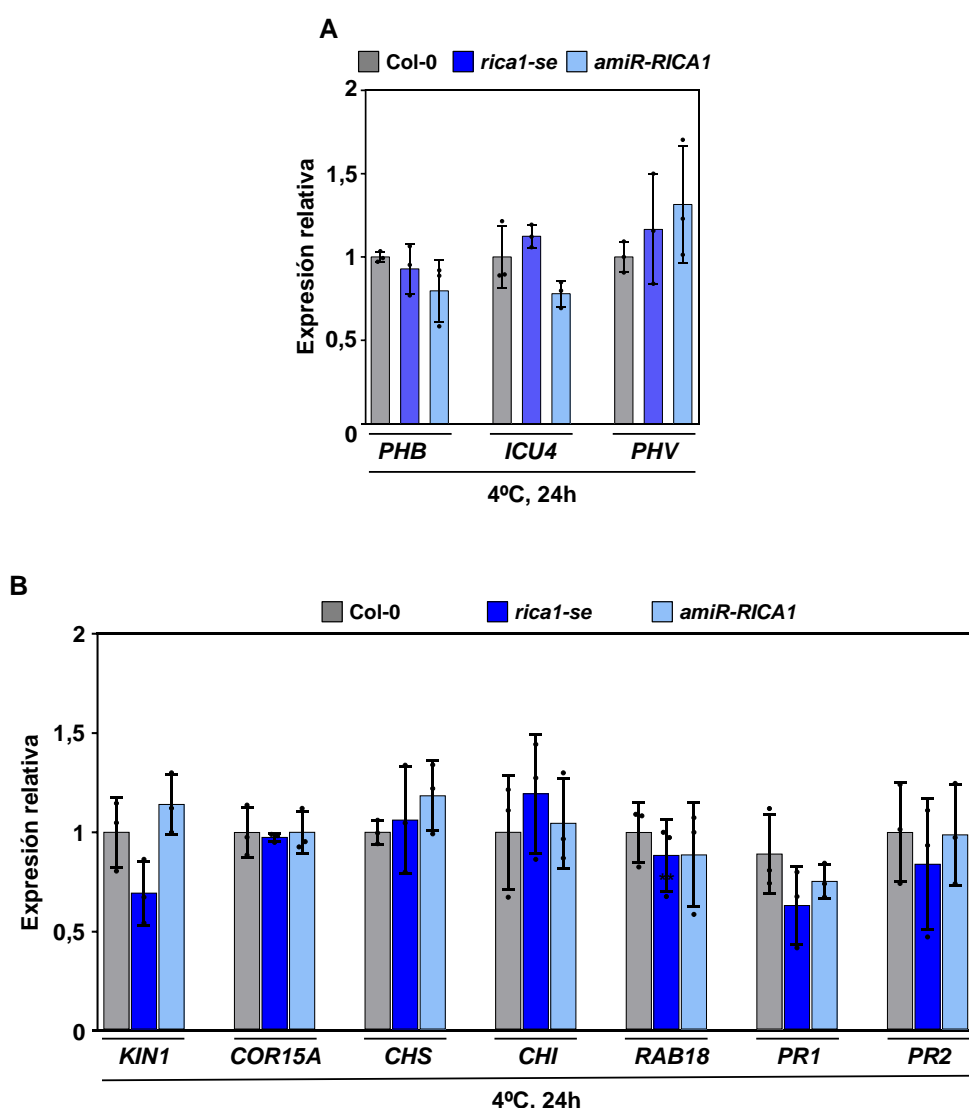
**Figura 9. *RICA1* no está implicado en la tolerancia de Arabidopsis al estrés salino ni al estrés hídrico.**

(A-B) Análisis de la tolerancia al estrés salino de plantas Col-0, *rica1-se* y *amiR-RICA1* de siete días de edad, expuestas a 0 mM, 100 mM y 150 mM NaCl durante siete días adicionales. Se cuantificó la longitud de la raíz principal (A) y el peso fresco de las plantas (B) tras los tratamientos. (C-D) Análisis de la tolerancia al estrés hídrico de plantas Col-0, *rica1-se* y *amiR-RICA1* de siete días de edad, expuestas a 0 mM, 200 mM y 300 mM sorbitol durante siete días adicionales. Se cuantificó la longitud de la raíz principal (C) y el peso fresco de las plantas (D) tras los tratamientos. En todos los casos, los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error representan la desviación estándar.

### 3.3.2. *RICA1* promueve el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas a través de una vía independiente a las definidas hasta ahora

Hace algunos años, se propuso que un eTM con identidad de secuencia a *RICA1*, *ath-eTM166*, regula en condiciones control los niveles de transcritos de los factores de la familia HD/ZIP/III (PHB, PHV, ICU4, REV y ATHB8) secuestrando al miRNA 166 (Wu et al., 2013). Los miRNAs 165/166, por otra parte, controlan los niveles de ABA promoviendo la degradación de transcritos de *PHB*, cuya proteína, a su vez, activa la expre-

sión de *BG1* y *ABI4*, dos genes implicados en la síntesis y señalización de ABA, respectivamente (Yan et al., 2016). Dado el papel del ABA como activador del proceso de aclimatación, nos planteamos si *RICA1* podría regular este proceso modulando la expresión de *PHB* u otros genes de la familia HD/ZIP/III. Para estudiar esta posibilidad, en primer lugar se analizó la expresión de *PHB*, *ICU4* y *PHV* en plantas *rica1-se* y *amiR-RICA1* de dos semanas expuestas a 4°C durante 24h, mediante ensayos de qPCR. Los resultados no revelaron diferencias significativas en los niveles de expresión de ninguno de esos genes entre plantas *rica1-se*, *amiR-RICA1* y plantas de genotipo silvestre (Figura 10A),



**Figura 10. *RICA1* regula el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas través de una vía independiente a las descritas.**

(A) Cuantificación de los niveles de transcritos de *PHB*, *ICU4* y *PHV* en plantas Col-0, *rica1-se* y *amiR-RICA1* de dos semanas expuestas a 4°C durante 24h. (B) Análisis de la expresión de genes marcadores de diferentes vías de señalización implicadas en el proceso de aclimatación en plantas Col-0, *rica1-se* y *amiR-RICA1* de dos semanas expuestas a 4°C durante 24h. En (A) y (B) los niveles de transcritos, analizados mediante experimentos de qPCR, están relativizados respecto a los niveles en Col-0 a las 24h de exposición a frío. Los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media y las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos (\*\*P < 0,01) indican diferencias significativas entre las plantas Col-0 y los mutantes *rica1-se* o *amiR-RICA1* calculadas mediante una prueba de T de Student.

lo que sugería que *RICA1* no participa en la regulación de la expresión de los genes diana del miRNA166 en condiciones de frío.

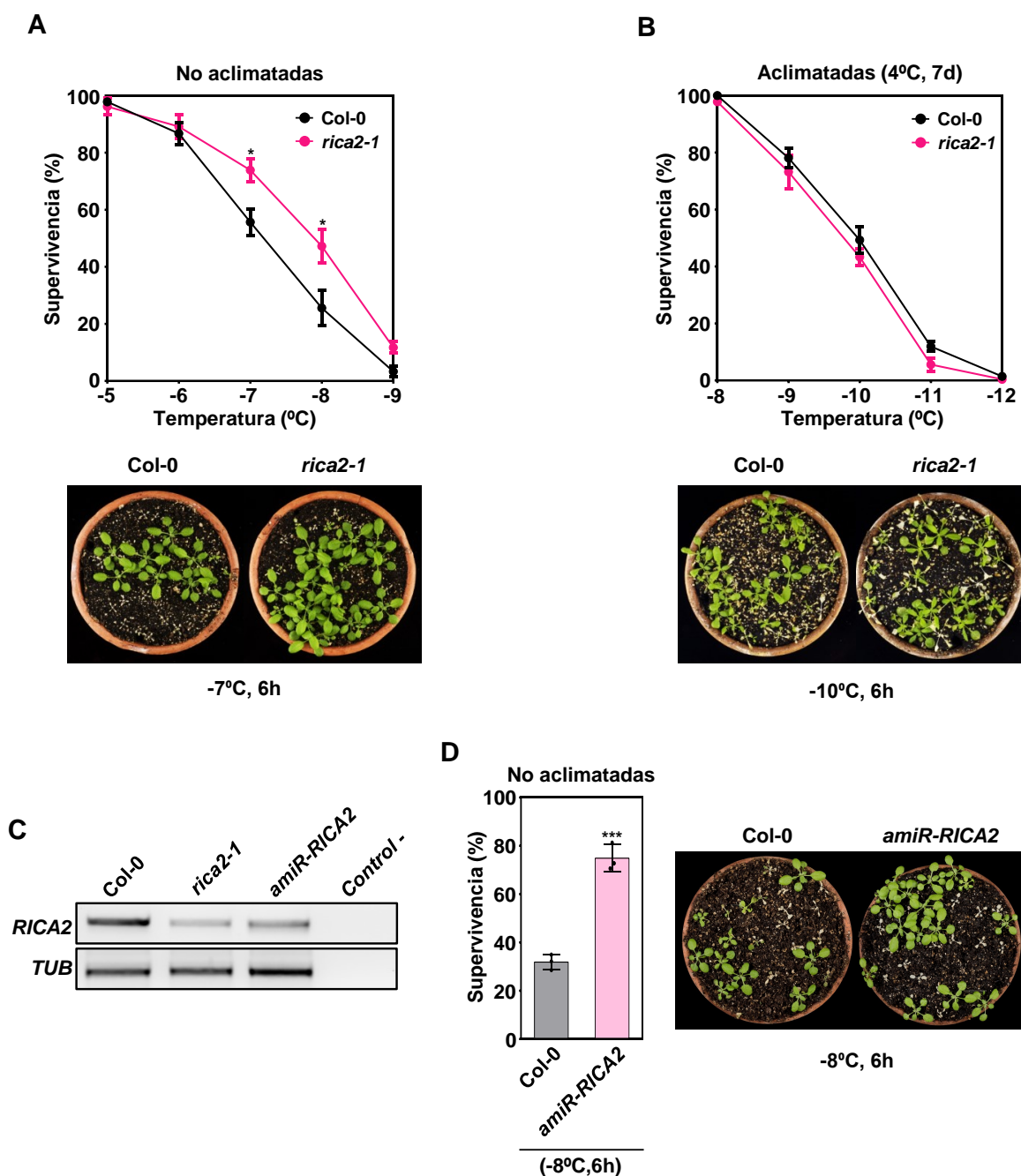
Como se ha mencionado en la Introducción de esta Tesis, el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas está regulado a través de diferentes vías de señalización. Con el fin de determinar si *RICA1* podría regular el proceso de aclimatación a través de algunas de las vías de señalización mejor definidas hasta ahora (Figura 1), se analizaron los niveles de expresión de diferentes genes marcadores de distintas vías en plantas Col-0, *rica1-se* y *amiR-RICA1* de dos semanas de edad expuestas a 4°C durante 24h. Así, se cuantificó la acumulación de transcritos correspondientes a *KIN1* y *COR15A* como marcadores de la vía mediada por los CBFs, de *CHS* y *CHI* como genes marcadores de la vía dependiente de *HY5*, *RAB18* como gen específico de la vía mediada por ABA, y *PR1* y *PR2* como genes marcadores de la vía dependiente de *NPR1*. El análisis puso de manifiesto que no existían cambios en la expresión de ninguno de los genes considerados, ni en *rica1-se* ni en *amiR-RICA1* (Figura 10B). Todos estos datos sugieren que *RICA1* regularía el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas través de una vía independiente a las definidas hasta el momento.

### 3.4. Caracterización funcional de *RICA2*

#### 3.4.1. *RICA2* regula negativamente la tolerancia constitutiva de Arabidopsis a las heladas

Para determinar si *RICA2* estaba implicado en la respuesta de Arabidopsis a las temperaturas bajas, se cuantificó la tolerancia constitutiva a la congelación, así como la capacidad para aclimatar, de plantas Col-0 y *rica2-1*. Los resultados obtenidos revelaron que el mutante *rica2-1* mostraba una tolerancia constitutiva a la congelación significativamente más alta que las plantas de genotipo silvestre, presentando unas  $LT_{50}$  de -8°C y -7,2°C, respectivamente (Figura 11A). Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en su capacidad de aclimatación, siendo la  $LT_{50}$  de -10°C tanto en Col-0 como en *rica2-1* (Figura 11B). Para confirmar estos resultados, se generó una línea *35s:amiRNA:RICA2* (*amiR-RICA2*) que silenciaba específicamente la expresión de *RICA2* (Figura 11C). El análisis de la tolerancia constitutiva a la congelación de esta línea indicó que las plantas *amiR-RICA2* eran significativamente más tolerantes que las de genotipo silvestre, al igual que ocurría con las plantas *rica2-1* (Figura 11D). Por tanto, se puede concluir que *RICA2* regula negativamente la tolerancia constitutiva de Arabidopsis a la congelación, pero no está implicado en el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

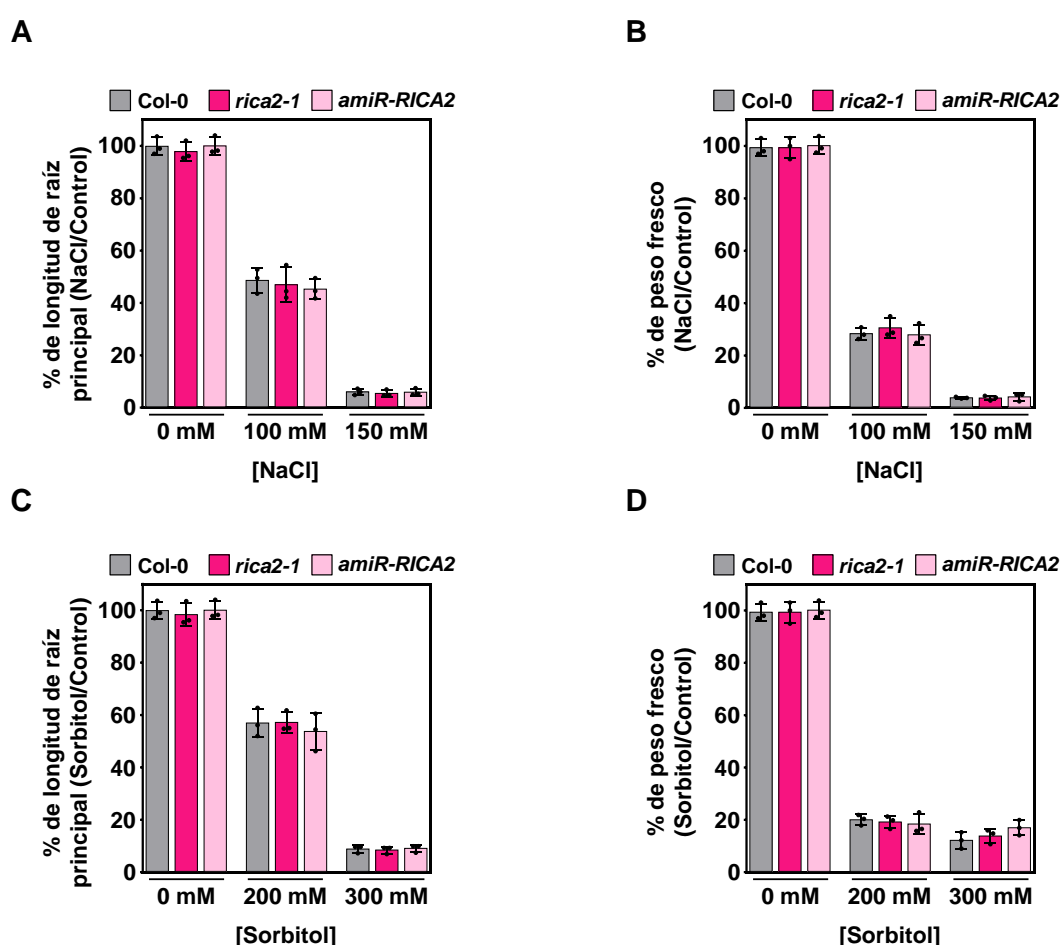




**Figura 11. *RICA2* regula negativamente la tolerancia constitutiva de *Arabidopsis* a la congelación.**

(A-B, paneles superiores) Porcentaje de supervivencia en plantas Col-0 y *rica2-1* de dos semanas de edad, sin aclimatar (A) y aclimatadas durante una semana a 4°C (B), sometidas a las temperaturas indicadas durante 6h. (A-B, paneles inferiores) Fotos representativas de plantas no aclimatadas (A) y aclimatadas durante 7 días a 4°C (B), congeladas a las temperaturas indicadas durante 6h, tras una semana de recuperación. En (A) y (B) los puntos representan la media de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. (C) Análisis de los niveles de *RICA2* en plantas Col-0, *rica2-1* y *amiR-RICA2*. Los niveles de transcritos se analizaron mediante experimentos de PCR semicuantitativa en plantas Col-0 y *amiR-RICA2* de dos semanas de edad. Se amplificó la *TUBULINA* (*TUB*) como control de carga. (D, panel izquierdo) Porcentaje de supervivencia en plantas Col-0 y *amiR-RICA2* de dos semanas de edad expuestas a -8°C durante 6h. Los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media y las barras de error representan la desviación estándar. (D, panel derecho) Imágenes representativas de plantas Col-0 y *amiR-RICA2* congeladas a -8°C durante 6h tras una semana de recuperación. En todos los casos los asteriscos indican diferencias significativas (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ) entre plantas Col-0 y *amiR-RICA2* calculadas mediante una prueba de T de Student.

Como se ha comentado previamente, los mecanismos de regulación de la respuesta de las plantas a las temperaturas bajas están estrechamente relacionados con los de las respuestas a otros estreses abióticos como la salinidad o la sequía. Para establecer si *RICA2* participaba en la respuesta de *Arabidopsis* al estrés salino o al estrés hídrico, se analizó la tolerancia del mutante *rica2-1* y *amiR-RICA2* a estos estreses. La Figura 12 muestra que no se encuentran diferencias en la tolerancia con respecto a las plantas Col-0 en ningún caso. Por tanto, *RICA2* no parece estar implicado en la respuesta de *Arabidopsis* al estrés salino ni al estrés hídrico.



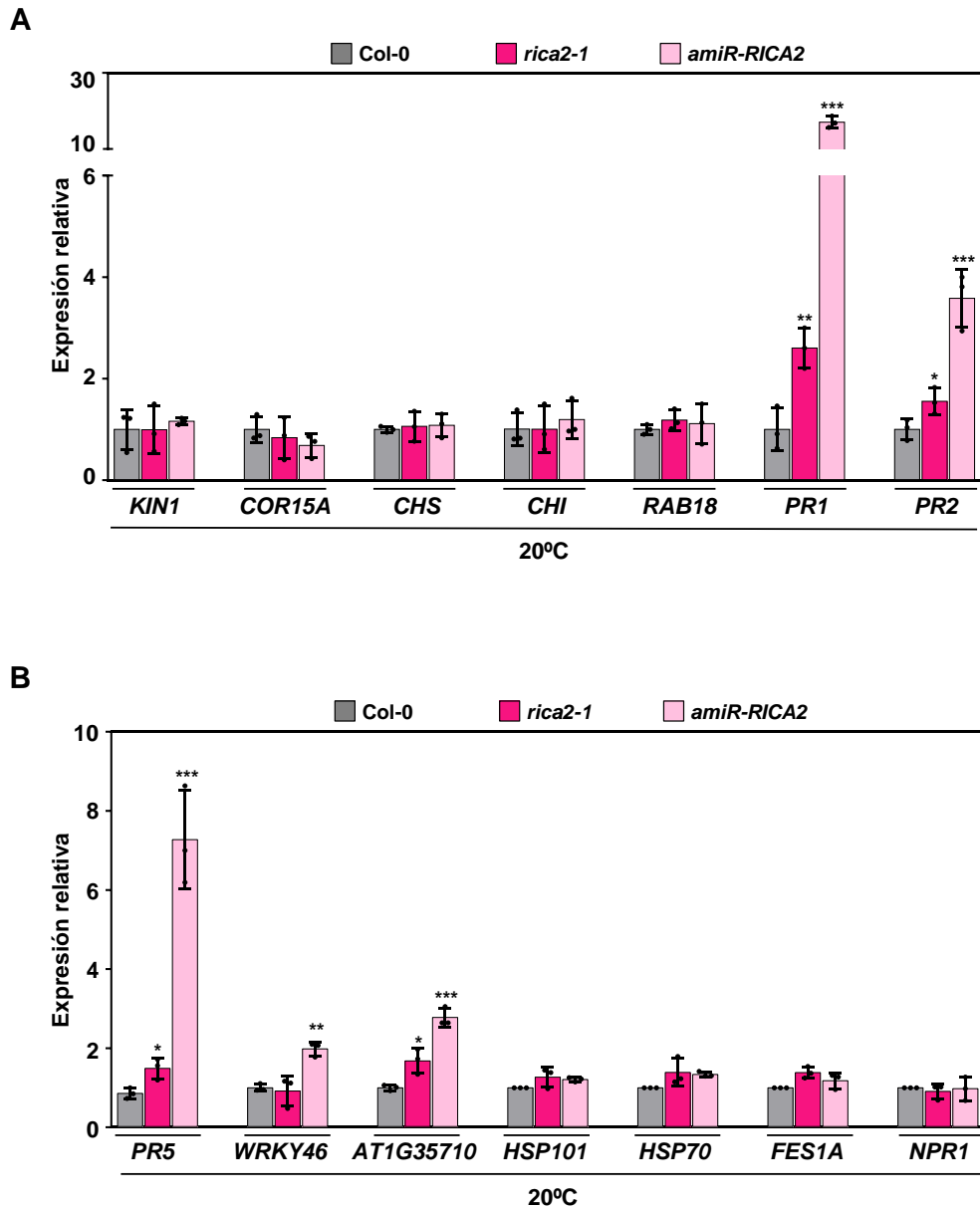
**Figura 12. *RICA2* no participa en la regulación de la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés salino ni al estrés hídrico.**

(A-B) Análisis de la tolerancia al estrés salino de plantas Col-0, *rica2-1* y *amiR-RICA2* de siete días de edad expuestas a 0mM, 100mM y 150mM NaCl durante siete días adicionales. Se cuantificó la longitud de la raíz principal (A) y el peso fresco de las plantas (B) tras el tratamiento. (C-D) Análisis de la tolerancia al estrés hídrico de plantas Col-0 y *amiR-RICA2* de siete días de edad y expuestas a 0mM, 200mM y 300mM sorbitol durante siete días adicionales. Se cuantificó la longitud de la raíz principal (C) y el peso fresco de las plantas (D) tras el tratamiento. En todos los casos, los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error representan la desviación estándar.

### 3.4.2. *RICA2* regula negativamente la tolerancia constitutiva a las heladas en *Arabidopsis* a través de la vía de señalización mediada por NPR1

Con el fin de determinar a través de que vía de señalización *RICA2* regula la tolerancia constitutiva de *Arabidopsis* a la congelación, se cuantificaron los niveles de transcritos de los genes marcadores anteriormente mencionados (ver apartado 3.4.2.) en plantas Col-0, *rica2-1* y *amiR-RICA2* de dos semanas de edad en condiciones control mediante experimentos de qPCR. Este análisis reveló que no existían diferencias significativas en los niveles de expresión de *KIN1*, *COR15A*, *CHS*, *CHI* o *RAB18* (Figura 13A). La expresión de *PR1* y *PR2*, sin embargo, era significativamente mayor en las plantas *rica2-1* y *amiR-RICA2* que en Col-0 (Figura 13A). Sugiriendo que *RICA2* podría estar regulando negativamente la tolerancia constitutiva a las heladas a través de la vía de señalización de la respuesta a temperaturas bajas mediada por el factor NPR1.

Como se ha comentado en la Introducción, NPR1 regula positivamente la respuesta de *Arabidopsis* a las temperaturas bajas interaccionando con los factores de transcripción HSF1As, activando la expresión de una serie de genes como *HSP101*, *HSP70* y *FES1A* (Olate et al., 2018). Además, NPR1 interaccionaría con otros factores de transcripción desconocidos hasta el momento, activando la expresión de otro grupo de genes entre los que se encuentran *PR1*, *PR2*, *PR5*, *WRKY46* y *AT1G35710* (Olate et al., 2018). Con el fin de determinar si *RICA2* regula negativamente la tolerancia constitutiva a la congelación a través de la vía de NPR1, se analizó la expresión *PR5*, *WRKY46*, *AT1G35710*, *HSP101*, *HSP70* y *FES1A* (Olate et al., 2018). Datos obtenidos mediante qPCR mostraron que los niveles de transcritos *PR5*, *WRKY46* y *AT1G35710* eran significativamente más altos en el mutante *rica2-1* y en la línea *amiR-RICA2* que en las plantas de genotipo silvestre (Figura 13B) Por el contrario, los niveles de *HSP101*, *HSP70* y *FES1A* no presentaban diferencias significativas entre las plantas Col-0, *rica2-1* y *amiR-RICA2*. Estos resultados indicaban que, efectivamente, *RICA2* regula negativamente la tolerancia constitutiva de *Arabidopsis* a las heladas controlando la vía de señalización mediada por NPR1 a través de su interacción con otros factores que HSF1As. El análisis de expresión de este gen en plantas Col-0, *rica2-1* y *amiR-RICA2* de dos semanas de edad en condiciones control no reveló diferencias significativas entre ellas (Figura 13B), sugiriendo que *RICA2* controla la vía de señalización mediada por NPR1 aguas abajo de este factor.

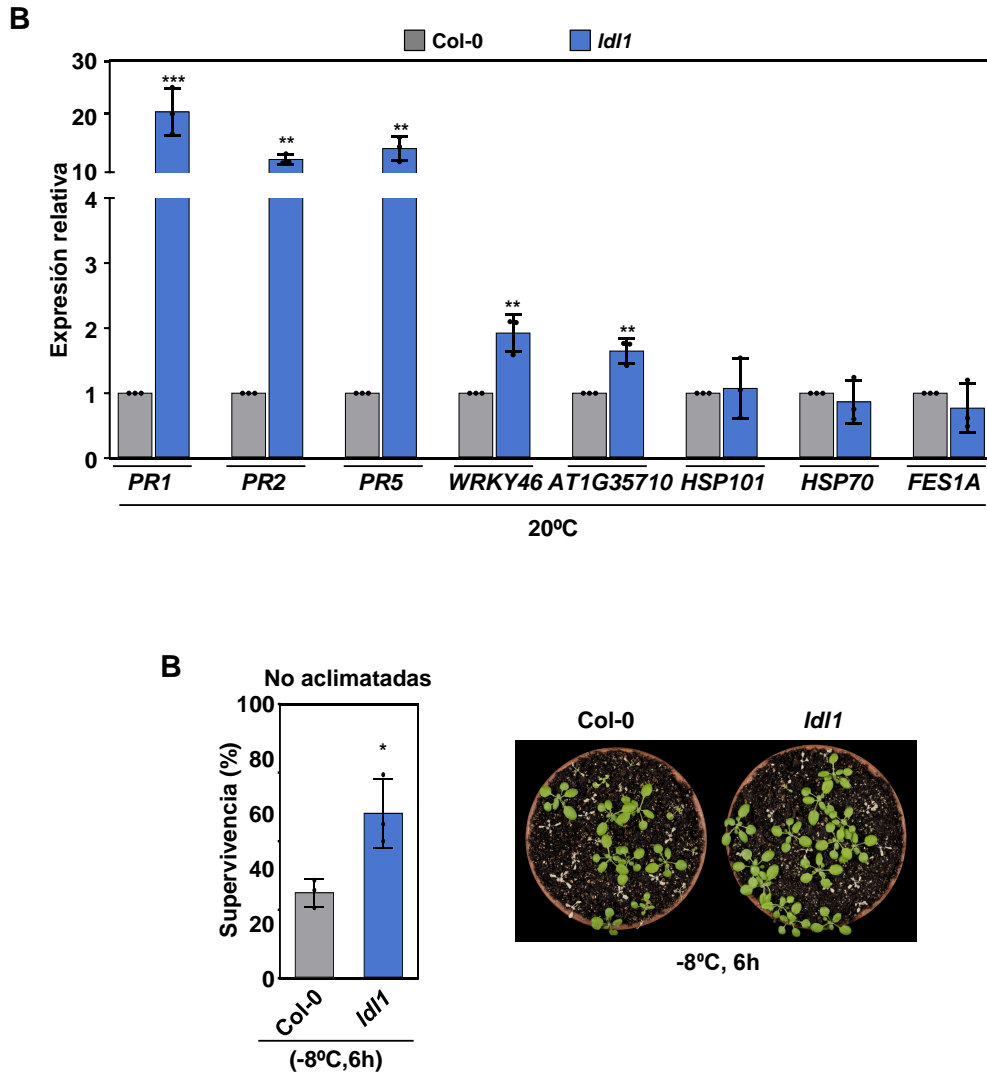


**Figura 13. *RICA2* regula negativamente la expresión de genes de la vía de señalización de la respuesta a temperaturas bajas mediada por NPR1.**

**(A)** Análisis de la expresión de genes marcadores de diferentes vías de señalización del proceso de aclimatación en plantas Col-0, *rica2-1* y *amiR-RICA2* de dos semanas de edad crecidas a 20°C. **(B)** Análisis de la expresión de genes pertenecientes a la ruta de señalización mediada por NPR1 en plantas Col-0, *rica2-1* y *amiR-RICA2* de dos semanas de edad en condiciones control. En todos los casos, los niveles de transcritos, analizados mediante experimentos de qPCR, están relativizados respecto a los niveles de Col-0 en condiciones control. Los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media y las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ) entre las plantas Col-0 y *rica2-1* o *amiR-RICA2* calculadas mediante una prueba de T de Student.

### 3.4.3. La demetilasa LDL1 regula negativamente la tolerancia constitutiva a las heladas en Arabidopsis a través de la vía de señalización mediada por NPR1

Diferentes estudios sugieren que varios de los genes de la vía de señalización mediada por NPR1 están regulados epigenéticamente a través de cambios en los niveles de metilación de H3K4 en sus promotores (Alvarez-Venegas et al., 2007; Berr et al., 2015; Mosher et al., 2006). Sabiendo la relevancia de los lncRNAs en el control epigenético de la expresión génica (Heo et al., 2013), existe la posibilidad de que *RICA2* pudiera regular la expresión de los genes de la vía mediada por NPR1 interaccionando con un complejo remodelador de la cromatina. La metilación de H3K4 está asociada a la activación transcripcional, de modo que *RICA2*, al ser un regulador negativo, debería actuar promoviendo la demetilación de H3K4, a través de su unión a una demetilasa. En animales, se ha descrito que el control de los niveles de metilación de H3K4 por la acción de la demetilasa LSD1 es dependiente de su interacción con un lncRNA llamado *HOTAIR* (Tsai et al., 2010). Este lncRNA, sirve como andamiaje para la unión de LSD1 y otras proteínas pertenecientes a la maquinaria remodeladora de cromatina, así como de proteínas de unión al DNA. En Arabidopsis, existen 4 proteínas homólogas de LSD1 (LDL1, LDL2, LDL3 y LDL4) (Spedaletti et al., 2008). Por tanto, cabe la posibilidad de que *RICA2* pueda actuar de la misma manera que *HOTAIR* uniéndose a alguna o a varias de las demetilasas homólogas de LSD1 y atenuar la expresión de genes de la vía mediada por NPR1. Para comprobar esta hipótesis, analizamos la expresión de los genes diana de NPR1 que estaban sobreexpresados en los mutantes *rica2-1* y *amiR-RICA2* (Figura 13), en plantas mutantes *ldl-1* de dos semanas crecidas a 20°C. Como control también se analizaron los niveles de *HSP101*, *HSP70* y *FES1A*. Los resultados revelaron que los niveles de expresión de *PR1*, *PR2*, *PR5*, *WRKY46* y *AT1G35710* eran significativamente más altos en el mutante *ldl-1* que en plantas Col-0 y que no había diferencias en la expresión de *HSP101*, *HSP70* y *FES1A* al igual que ocurría en los mutantes *rica2-1* y *amiR-RICA2* (Figura 14A). Estos resultados indicaban que LDL1 regula la expresión génica de la misma vía que *RICA2*, por lo que también debería regular negativamente la tolerancia constitutiva de Arabidopsis a la congelación. La Figura 14B muestra que, efectivamente, las plantas *ldl-1* eran más tolerantes a las heladas que las de genotipo silvestre. Todos estos resultados sugieren que *RICA2* regula negativamente la tolerancia constitutiva de Arabidopsis a las heladas atenuando parte de la expresión génica mediada por NPR1 a través de demetilasa LDL1.



**Figura 14. *LDL1* regula negativamente la tolerancia constitutiva de *Arabidopsis* a la congelación, controlando la expresión de genes de la vía de señalización de la respuesta a temperaturas bajas mediada por NPR1.**

(A) Análisis de la expresión de genes pertenecientes a la ruta de señalización mediada por NPR1 en plantas Col-0 y *ldl1* de dos semanas de edad en condiciones control. Los niveles de transcritos, analizados mediante experimentos de qPCR, están relativizados respecto a los niveles de Col-0 en condiciones control. (B, panel izquierdo) Porcentaje de supervivencia en plantas Col-0 y *ldl1* de dos semanas de edad expuestas a -8°C durante 6h. (B, panel derecho) Imágenes representativas de plantas Col-0 y *ldl1* congeladas a -8°C durante 6h tras una semana de recuperación. En todos los casos, los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media y las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ) entre las plantas Col-0 y los mutantes *ldl1*, calculadas mediante una prueba de T de Student.

### 3.5. Caracterización funcional de *RICA3*

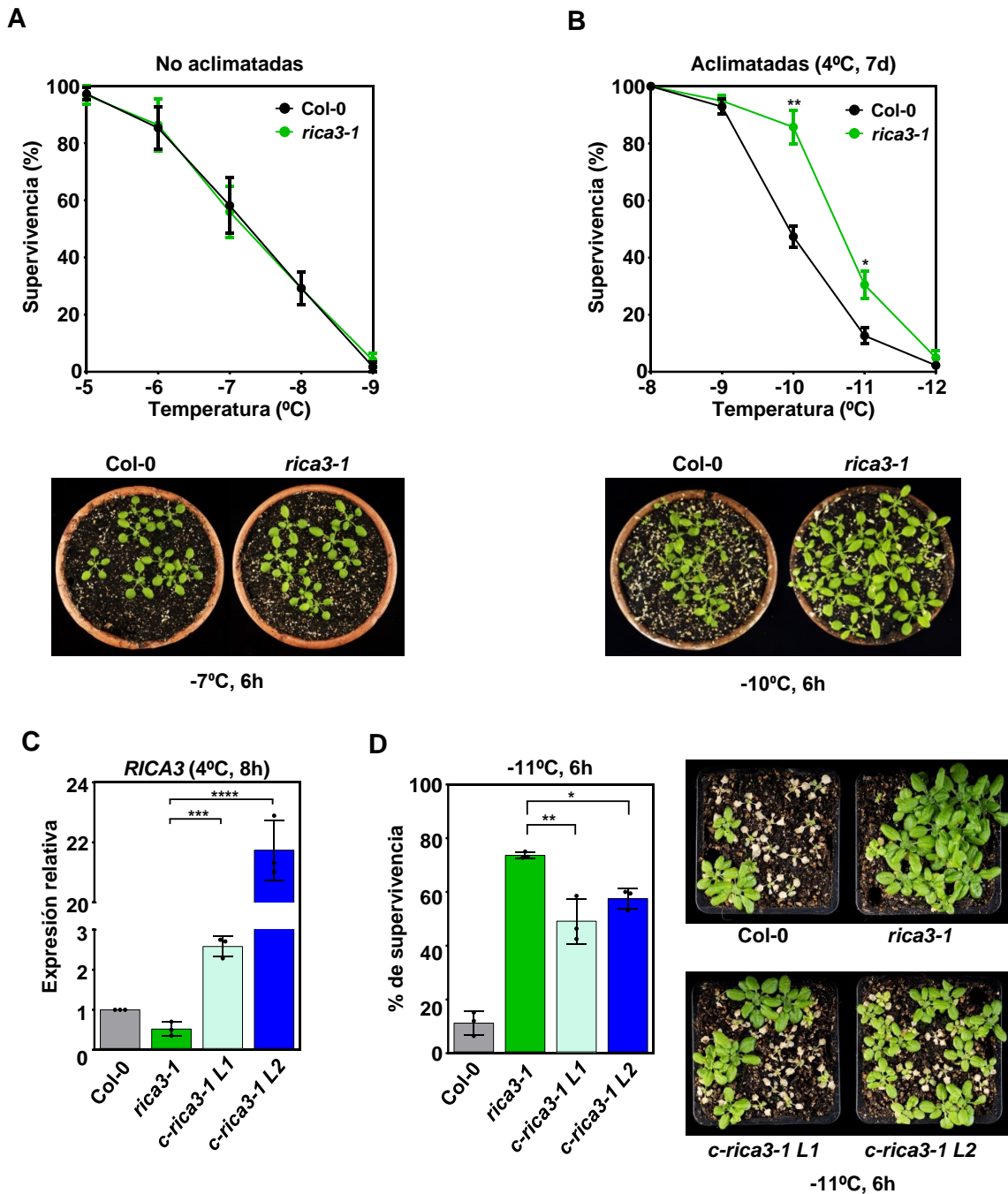
#### 3.5.1. *RICA3* regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis

El papel de *RICA3* en la respuesta de Arabidopsis a las temperaturas bajas se determinó analizando la tolerancia constitutiva a las heladas y la capacidad de aclimatación de plantas *rica3-1*. Estos experimentos pusieron de manifiesto que no existían diferencias significativas en la tolerancia constitutiva a las temperaturas de congelación entre los mutantes *rica3-1* y Col-0, con una  $LT_{50}$  en torno a  $-7^{\circ}\text{C}$  en ambos casos (Figura 15A). Las plantas *rica3-1*, sin embargo, mostraban incrementada significativamente su capacidad de aclimatación respecto a las plantas de genotipo silvestre, presentando una  $LT_{50}$  de  $-10,7^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ , respectivamente (Figura 15B). Para poder corroborar estos resultados, los mutantes *rica3-1* se transformaron con una construcción que contenía la región genómica de *RICA3*, incluyendo 1 Kb de su promotor. De este modo, se obtuvieron 2 líneas *rica3-1* que mostraban niveles de expresión *RICA3* en respuesta a  $4^{\circ}\text{C}$ , significativamente superiores a los de las plantas Col-0. Estas líneas se denominaron *c-rica3-1 L1* y *c-rica3-1 L2* (Figura 15C). El análisis de la capacidad para aclimatar de estas líneas reveló que, en ambos casos, recuperaban prácticamente la capacidad de las plantas de genotipo silvestre (Figura 15D), confirmando que el fenotipo de tolerancia de las plantas *rica3-1* era debido a la ausencia de expresión de *RICA3* y, por tanto, que este lncRNA actúa como un regulador negativo del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis.

Los análisis de tolerancia de las plantas *rica3-1* y *c-rica3-1 L1* al estrés salino e hídrico no revelaron ninguna diferencia significativa con las plantas Col-0 (Figura 16). Por tanto, se pudo concluir que *RICA3* no está implicado en la tolerancia de Arabidopsis al estrés hídrico, ni al estrés salino.

#### 3.5.2. *RICA3* atenúa el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis controlando la expresión de *CBF2*

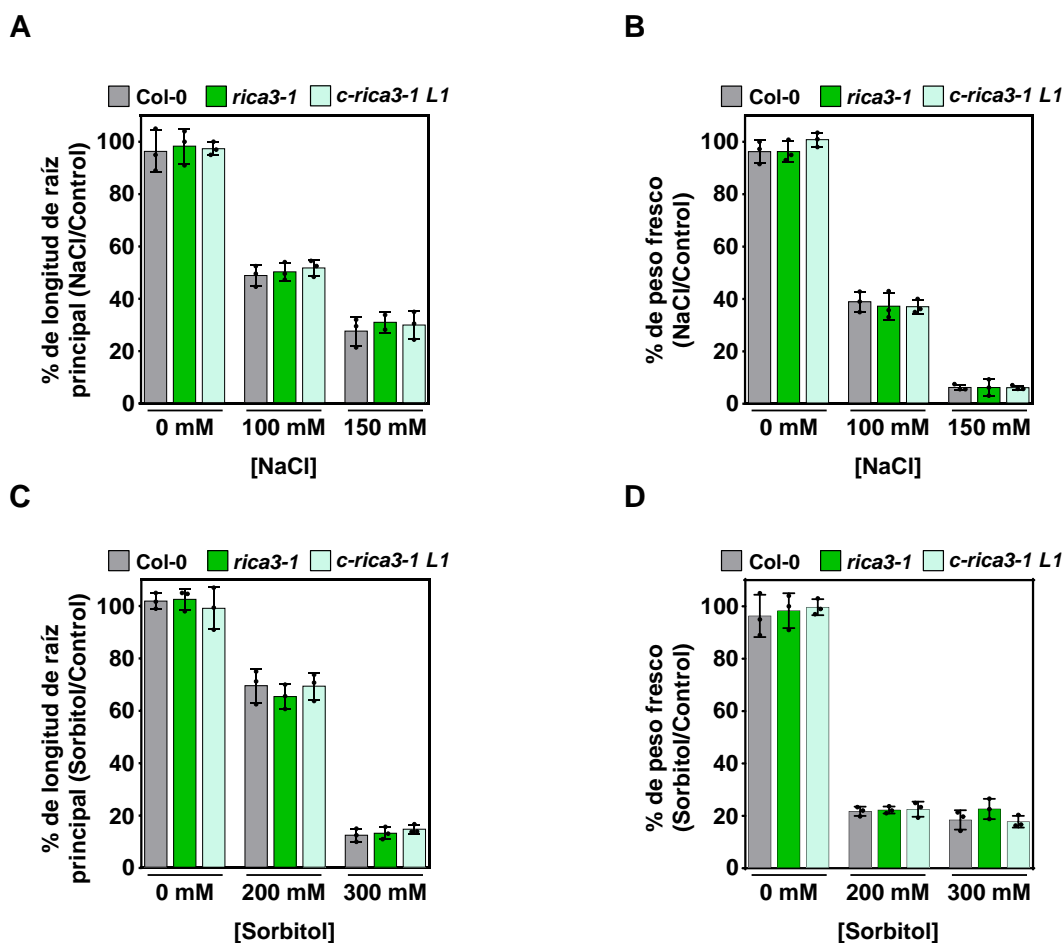
La pregunta que surge de los resultados es como *RICA3* regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis. Numerosos lncRNAs actúan regulando la expresión de sus genes vecinos (Rinn y Chang, 2012; Wu et al., 2016), por lo que cabía la posibilidad de que *RICA3* controlara el proceso de aclimatación atenuando la expresión de todos o algún CBF que, como se ha comentado en la Introducción son reguladores clave del proceso de aclimatación (Barrero-Gil y Salinas,



**Figura 15. *RICA3* regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis*.**

(A-B, paneles superiores) Porcentaje de supervivencia de plantas Col-0 y *rica3-1* de dos semanas, sin aclimatar (A) y aclimatadas durante una semana a 4°C (B) sometidas a las temperaturas indicadas durante 6h. (A-B, paneles inferiores) Fotos representativas de plantas no aclimatadas (A) y aclimatadas durante 7 días a 4°C (B), congeladas a las temperaturas indicadas durante 6h, tras una semana de recuperación. En (A) y (B) los puntos representan la media de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. (C) Análisis de la expresión de *RICA3* en plantas Col-0, *rica3-1*, *c-rica3-1* L1 y *c-rica3-1* L2 de dos semanas, tratadas durante 8h a 4°C. Los niveles de expresión se cuantificaron mediante qPCR y se relativizaron respecto a los niveles de expresión de las plantas Col-0. (D, panel izquierdo) Análisis de la tolerancia a la congelación de plantas Col-0, *rica3-1*, *c-rica3-1* L1 y L2 de dos semanas aclimatadas durante 7 días a 4°C y posteriormente sometidas a -11°C durante 6h. (D, panel derecho) Fotos representativas de plantas aclimatadas durante una semana a 4°C y posteriormente expuestas a -11°C durante 6h, tras una semana de recuperación. En (C) y (D) Los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media y las barras de error muestran la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001, \*\*\*\*P < 0,0001) entre plantas Col-0 y mutantes *rica3-1* (A y B) y entre mutantes *rica3-1* y las plantas *c-rica3-1* (C y D) calculadas mediante una prueba de T de Student



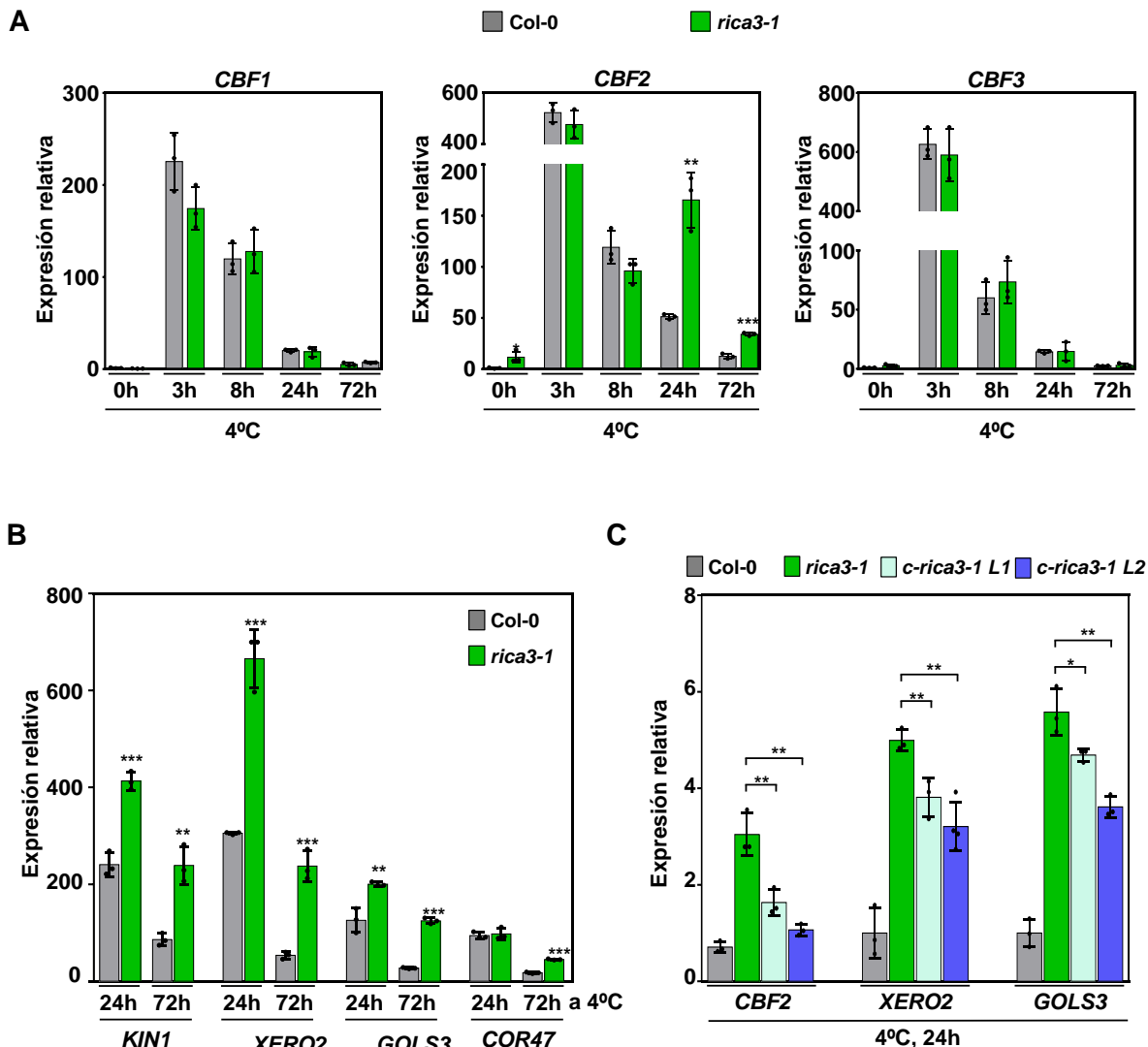


**Figura 16. *RICA3* no está implicado en la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés salino ni al estrés hídrico.**

(A-B) Cuantificación de la tolerancia al estrés salino de plantas Col-0, *rica3-1* y *c-rica3-1 L1* de siete días expuestas a 0mM, 100mM y 150mM NaCl durante siete días adicionales. Se evaluó la longitud de la raíz principal (A) y el peso fresco de las plantas (B) tras los tratamientos. (C-D) Cuantificación de la tolerancia al estrés hídrico de plantas Col-0 y *rica3-1* de siete días expuestas a 0mM, 200mM y 300mM sorbitol durante siete días adicionales. Se evaluó la longitud de la raíz principal (C) y el peso fresco de las plantas (D) tras los tratamientos. En todos los casos, los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error muestran la desviación estándar.

2018; Shi et al., 2018). Para validar esta hipótesis, se determinó la expresión de los tres genes *CBFs*, mediante qPCR, en muestras de plantas Col-0 y *rica3-1* de dos semanas de edad crecidas en condiciones control y posteriormente expuestas durante diferentes periodos a 4°C. Estos experimentos pusieron de manifiesto que la inducción de *CBF2* tras 24h de exposición a frío era significativamente mayor en las plantas *rica3-1* que en Col-0 (Figura 17A). Sin embargo, no existían diferencias significativas en los niveles de transcritos de *CBF1* y *CBF3* (Figura 17A). Coherentemente con estos resultados, la inducción de varios genes diana de los *CBFs* como *KIN1*, *XERO2*, *GOLS3* y *COR47* era significativamente más alta en plantas *rica3-1* que en plantas Col-0, tanto a 24 como a 72h a 4°C (Figura 17B). Además, los niveles de inducción de *CBF2*, *XERO2* y *GOLS3* en las líneas *c-rica3-1 L1* y *rica3-1 L2* expuestas 24h a 4°C eran significativamente más

bajas que los del mutante *rica3-1* (Figura 17C) confirmando que *RICA3* regula negativamente el proceso de aclimatación controlando la inducción de *CBF2* en respuesta a temperaturas bajas.



**Figura 17. *RICA3* regula negativamente la expresión de *CBF2*.**

(A) Análisis de la expresión de *CBF1*, *CBF2* y *CBF3* en plantas Col-0 y *rica3-1* de dos semanas de edad, expuestas a 4°C durante los tiempos indicados. (B) Análisis de la expresión de algunos genes dianas de los CBFs en plantas Col-0 y *rica3-1* de dos semanas de edad, expuestas a 4°C durante 24h y 72h. En ambos casos los niveles de expresión se cuantificaron mediante qPCR y están relativizados respecto a los niveles de expresión en plantas Col-0 a tiempo 0h. Los asteriscos indican diferencias significativas (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ) entre plantas Col-0 y mutantes *rica3-1* calculadas mediante una prueba de T de Student. (C) Análisis de la expresión de *CBF2*, *XERO2* y *GOLS3* en plantas Col-0, *rica3-1*, *c-rica3-1 L1* y *c-rica3-1 L2* de dos semanas, expuestas durante 24h a 4°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ) entre mutantes *rica3-1* y las plantas *c-rica3-1* calculadas mediante una prueba de T de Student. En todos los casos los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error muestran la desviación estándar.

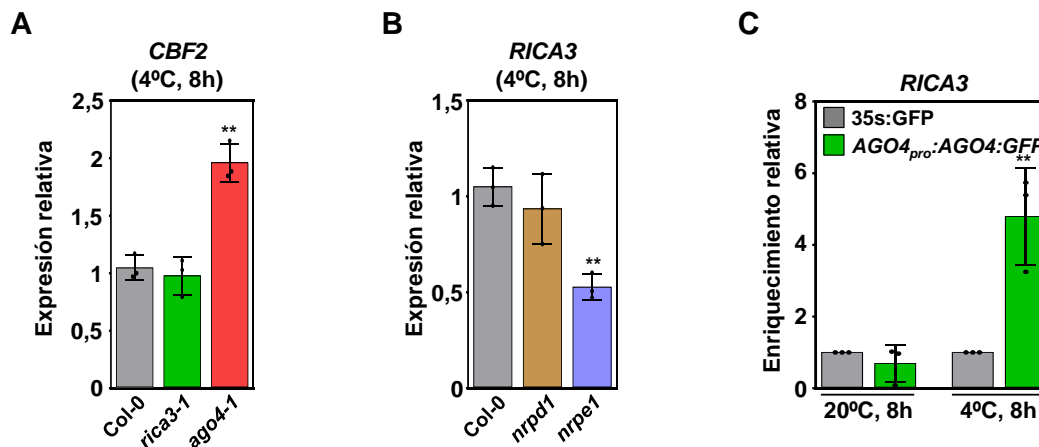
### 3.5.3. *RICA3* controla la inducción de *CBF2* en respuesta a las temperaturas bajas y el proceso de aclimatación en *Arabidopsis* a través de la vía RdDM

Recientemente, Au et al., (2017) han puesto de manifiesto que AGO4, un componente central de la maquinaria de metilación de DNA de la vía RdDM, se encuentra asociado a la cromatina en la región cromosómica de *CBF2*. Estos resultados sugieren que la inducción de *CBF2* en respuesta a las temperaturas bajas podría estar controlada a través de la vía RdDM y, por tanto, que *RICA3* podría atenuar dicha inducción a través de esta vía. Con el fin de estudiar esta posibilidad, en primer lugar se determinó el patrón de expresión de *CBF2* en respuesta a frío en un mutante nulo para AGO4 (*ago4-1*) (Zilberman et al., 2003). Los resultados demuestran que, tras estar expuesto 8h a 4°C, el mutante *ago4-1* tenía incrementados significativamente los niveles de mensajeros de *CBF2* en comparación con plantas Col-0 y *rica3-1* (Figura 18A) indicando que la inducción de *CBF2* en respuesta a las temperaturas bajas está regulada negativamente a través de la vía RdDM.

Dado que los lncRNAs que participan en la vía RdDM suelen ser transcritos por las polimerasas IV o V (Wierzbicki, 2012), si *RICA3* controla la inducción de *CBF2* a través de RdDM, debería ser transcrito por alguna de estas dos polimerasas. El análisis de expresión de *RICA3* en plantas Col-0 y en mutantes deficientes de la subunidad 1 de la polimerasa IV (*nprp1*) o V (*nrpe1*) (Onodera et al., 2005; Pontes et al., 2006) expuestas 8h a 4°C, reveló que los niveles de transcritos de *RICA3* en los mutantes *nprp1* eran similares a los de las plantas Col-0, pero que la ausencia de la subunidad 1 de la polimerasa V reducía significativamente la inducción de *RICA3* (Figura 18B). Estos resultados indicaban que la polimerasa V transcribe este lncRNA.

Posteriormente, consideramos la posibilidad de que *RICA3* pudiera controlar la inducción de *CBF2* interaccionando directamente con AGO4. Para determinar si este era el caso, se realizó un experimento de RIP con muestras de plantas mutantes *ago4-1* que expresaban la proteína de fusión AGO4-GFP bajo el promotor endógeno de AGO4 (*AGO4<sub>pro</sub>:AGO4:GFP*) (Ye et al., 2012). Como control de la especificidad de interacción entre *RICA3* y AGO4, se utilizaron plantas Col-0 que expresaban la construcción *35S:GFP*. Los transcritos de *RICA3* que coimmunoprecipitaban con la proteína de fusión AGO4-GFP en condiciones control o de frío (8h a 4°C), se cuantificaron mediante qPCR. La Figura 18C muestra que únicamente existía un enriquecimiento de *RICA3* en las muestras de plantas *AGO4<sub>pro</sub>:AGO4:GFP* expuestas a 4°C, demostrando que *RICA3* interacciona de manera específica con AGO4 en respuesta a temperaturas bajas. Estos resultados sugieren que *RICA3* regula negativamente el proceso de aclimatación a las

temperaturas bajas en *Arabidopsis* atenuando la inducción de *CBF2* a través de la vía RdDM, mediante su interacción con AGO4.



**Figura 18. *RICA3* atenúa la inducción de *CBF2* en respuesta a las temperaturas bajas a través de la vía RdDM, interaccionando con AGO4.**

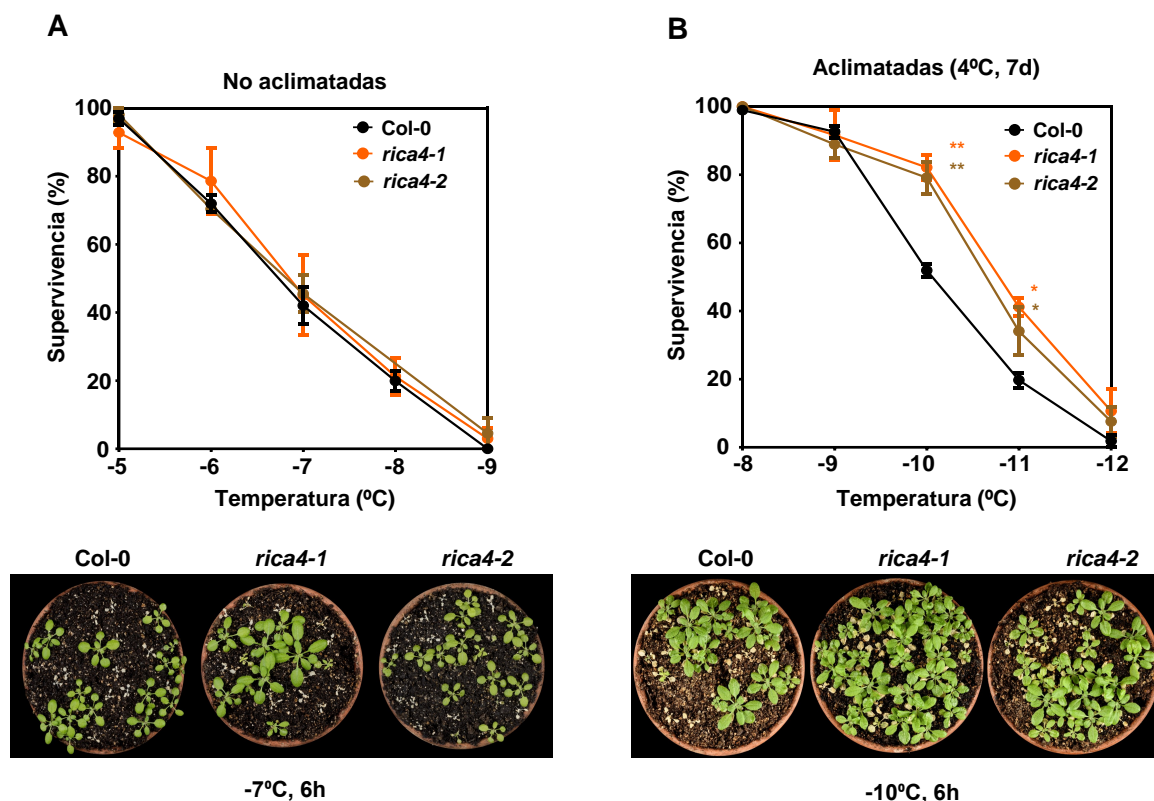
(A) Análisis de la inducción de *CBF2* en plantas Col-0, *rica3-1* y *ago4-1* de dos semanas, expuestas durante 8h a 4°C. (B) Análisis de la expresión de *RICA3* en plantas Col-0, *nrpd1* y *nrpe1* de dos semanas, expuestas durante 8h a 4°C. En (A) y (B), los niveles de expresión se cuantificaron mediante qPCR y se relativizaron respecto a los niveles en plantas Col-0. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001) entre los mutantes y las plantas Col-0 calculadas mediante una prueba de T de Student. (C) Ensayo RIP con plantas AGO4<sub>pro</sub>:AGO4:GFP expuestas durante 8h a 4°C. Como control de especificidad se utilizaron plantas 35S:GFP. Se cuantificaron los niveles de *RICA3* presentes en la fracción inmunoprecipitada en condiciones control y de frío mediante qPCR. Los niveles de *RICA3* inmunoprecipitados en plantas con la proteína de fusión AGO4:GFP se relativizaron respecto a los niveles inmunoprecipitados en las plantas control. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*\*P < 0,01) entre plantas que contenían la construcción pAGO4:AGO4:GFP y las plantas control calculadas mediante una prueba de T de Student. En todos los casos, los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error muestran la desviación estándar.

### 3.6. Caracterización funcional de *RICA4*

#### 3.6.1. *RICA4* regula positivamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis*

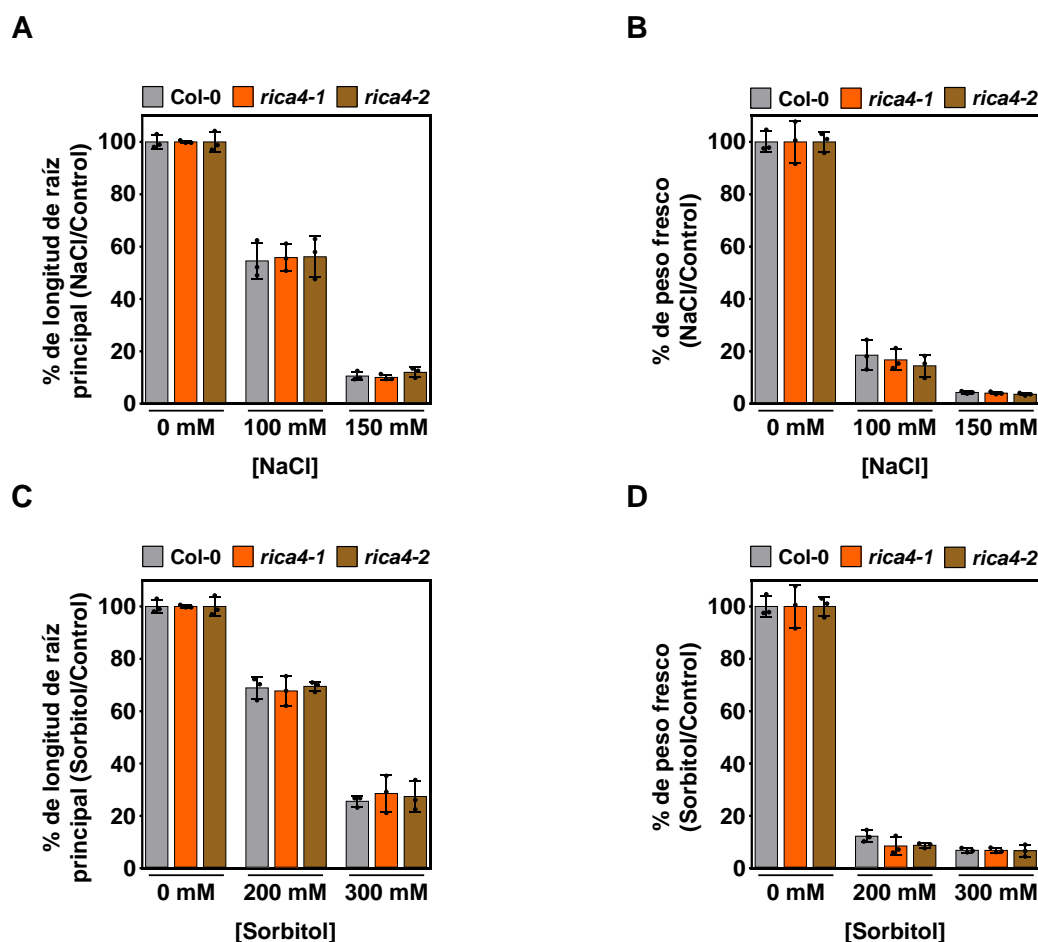
Con el fin de establecer el papel de *RICA4* en la respuesta de *Arabidopsis* a las temperaturas bajas, se analizó la tolerancia a las heladas de los mutantes *rica4-1* y *rica4-2* antes y después de haber sido aclimatados 7 días a 4°C. Los ensayos pusieron de manifiesto que no existían diferencias significativas entre los mutantes y las plantas Col-0 en su tolerancia constitutiva a las heladas (LT<sub>50</sub> ~ -7°C) (Figura 19A). Por el contrario, ambos mutantes *rica4* presentaban una capacidad de aclimatación significativamente ma-

por que las plantas de genotipo silvestre siendo sus  $LT_{50}$   $-10,8^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$  respectivamente (Figura 19B).



**Figura 19. *RICA4* regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis*.** (A-B, paneles superiores) Porcentaje de supervivencia de plantas Col-0, *rica4-1* y *rica4-2* de dos semanas de edad sin aclimatar (A) y aclimatadas durante una semana a  $4^{\circ}\text{C}$  (B), sometidas a las temperaturas indicadas durante 6h. Los puntos representan la media de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas (\* $P < 0,05$ ) entre las plantas Col-0 y los mutantes *rica4*, calculadas mediante una prueba de T de Student. (A-B, paneles inferiores) Fotos representativas de plantas no aclimatadas (A) y aclimatadas durante 7 días a  $4^{\circ}\text{C}$  (B), congeladas a las temperaturas indicadas durante 6h, tras una semana de recuperación.

Los análisis de tolerancia de los mutantes *rica4* al estrés hídrico y salino revelaron que no existían diferencias significativas ni en la longitud de la raíz principal ni en el peso fresco entre plantas silvestres y mutantes *rica4* en presencia de altas concentraciones de NaCl ni de sorbitol (Figura 20). Todos estos resultados demostraban que *RICA4* regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas, pero no está involucrado en la respuesta de *Arabidopsis* al estrés salino ni al estrés hídrico.

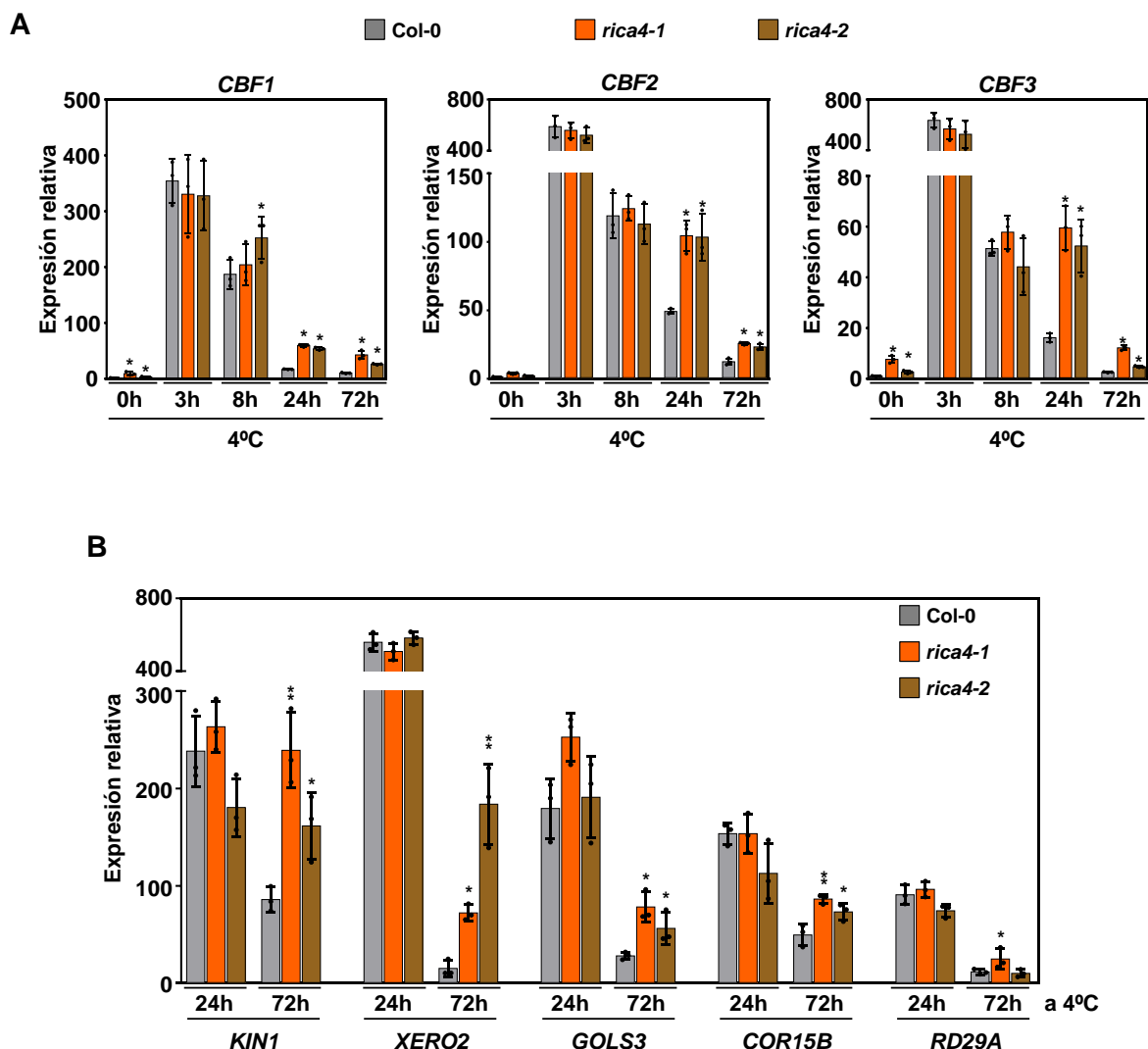


**Figura 20. *RICA4* no está implicado en la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés salino ni al estrés hídrico.**

(A-B) Cuantificación de la tolerancia al estrés salino de plantas Col-0, *rica4-1* y *rica4-2* de siete días de edad expuestas a 0mM, 100mM y 150mM NaCl durante siete días adicionales. Se evaluó la longitud de la raíz principal (A) y el peso fresco de la planta (B) tras los tratamientos. (C-D) Cuantificación de la tolerancia al estrés hídrico en plantas Col-0, *rica4-1* y *rica4-2* de siete días de edad expuestas a 0mM, 200mM y 300mM sorbitol durante siete días adicionales. Se cuantificó la longitud de la raíz principal (C) y el peso fresco de las plantas (D) tras los tratamientos. En todos los casos, los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error muestran la desviación estándar.

### 3.6.2. *RICA4* controla el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis* atenuando la expresión de los *CBFs*

Dada su localización y patrón de expresión, nos planteamos si, de manera similar a *RICA3*, *RICA4* también podría regular la inducción de los *CBFs* en respuesta a frío. Para estudiar esta posibilidad, se determinó la expresión de dichos genes en plantas Col-0 y *rica4* crecidas en condiciones control durante dos semanas y expuestas posteriormente a 4°C durante diferentes tiempos. Estos experimentos mostraron que, efectivamente, los niveles de inducción de todos los *CBFs* eran mayores en los mutantes *rica4* que en las plantas de genotipo silvestre tras 24 y 72h a 4°C (Figura 21A). Consistentemente, los genes diana de los *CBFs* mostraban mayores niveles de inducción en los mutantes *rica4* que en las plantas Col-0 tras 72h a 4°C (Figura 21B).



**Figura 21. *RICA4* regula negativamente la expresión de los *CBFs*.**

**(A)** Análisis de la inducción de *CBF1*, *CBF2* y *CBF3* en plantas Col-0, *rica4-1* y *rica4-2* de dos semanas de edad, expuestas a 4°C durante los tiempos indicados. **(B)** Análisis de la inducción de varios genes diana de los *CBFs* en plantas Col-0, *rica4-1* y *rica4-2* de dos semanas de edad, expuestas a 4°C durante 24h y 72h. En ambos casos, los niveles de expresión se cuantificaron mediante qPCR y se relativizaron respecto a los niveles en plantas Col-0 a tiempo 0h. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*P < 0,05, \*\*P < 0,01) entre plantas Col-0 y mutantes *rica4*, calculadas mediante una prueba de T de Student. Los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error muestran la desviación estándar.

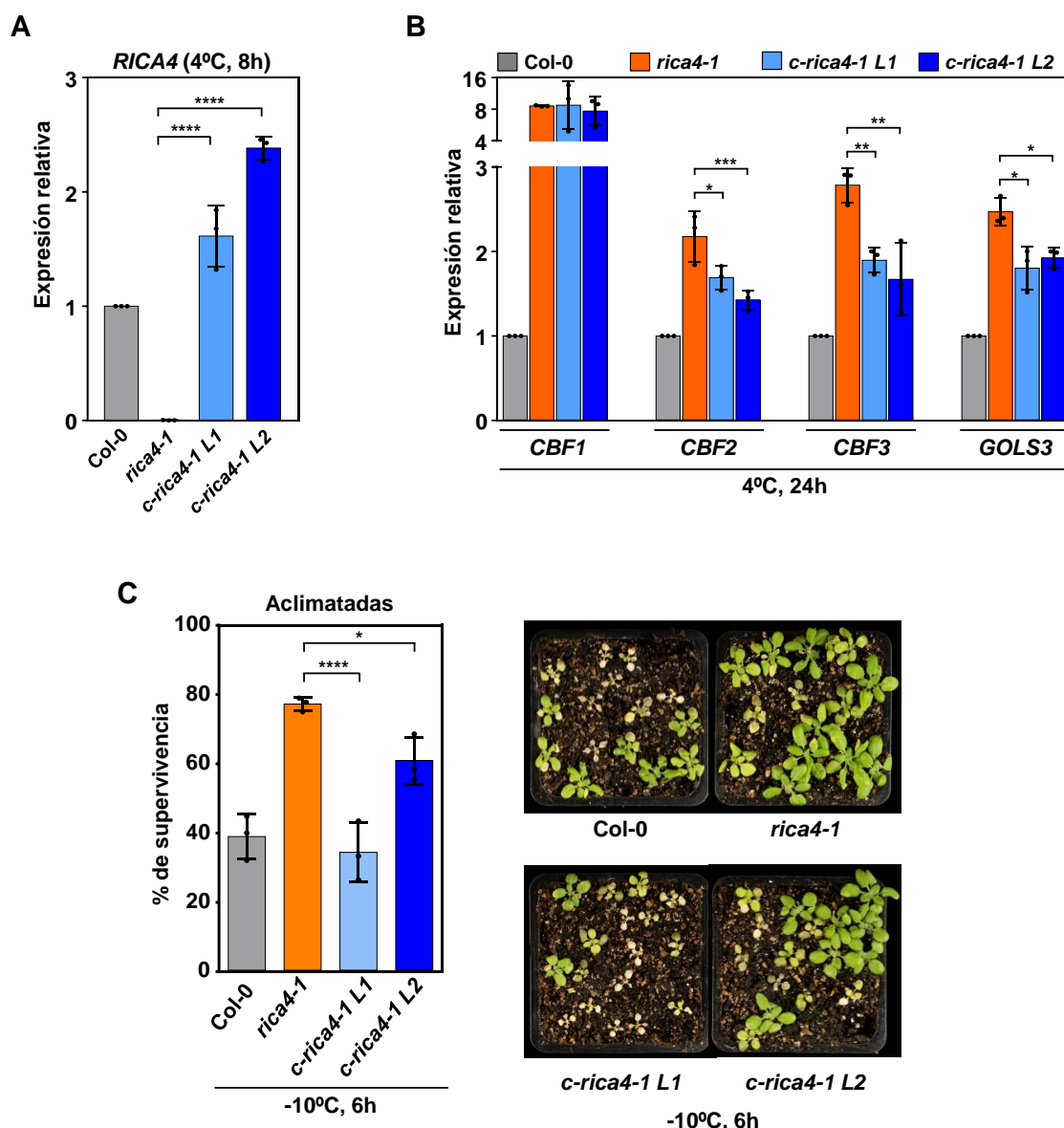
Una cuestión importante que surgía de estos resultados era si se debían a la ausencia de *RICA4* o a un posible efecto de las inserciones de los T-DNAs en los mutantes *rica4* sobre los propios *CBFs*. Con el objetivo de aclarar esta cuestión, se transformaron plantas *rica4-1* con una región genómica de *RICA4* que incluía 1 Kb de su promotor obteniéndose dos líneas independientes denominadas *c-rica4-1 L1* y *c-rica4-1 L2* que recuperaban la inducción de *RICA4* en respuesta a frío (Figura 22A). El análisis de inducción de los *CBFs* en estas líneas reveló que los niveles de transcritos de *CBF2* y *CBF3*, aunque no llegaban a recuperar los valores de las plantas silvestres, eran significativamente más bajos que los del mutante *rica4-1* (Figura 22B). Del mismo modo, las líneas *c-rica4-*

1 también recuperaban parcialmente los niveles de transcritos correspondientes al gen diana de los CBFs, *GOLS3* (Figura 22B). Cabe resaltar, sin embargo, que no se apreciaron diferencias significativas en los niveles de transcritos de *CBF1* entre las plantas *rica4-1* y las líneas *c-rica4-1* (Figura 22B). Como cabía esperar, además, las líneas *c-rica4-1 L1* y *c-rica4-1 L2* mostraban una capacidad de aclimatación similar a la de las plantas Col-0. (Figura 22C). Estos resultados confirmaron que los patrones de inducción de *CBF2* y *CBF3* que muestran las plantas mutantes *rica4* son ocasionados por la ausencia de *RICA4*. El aumento en los niveles de inducción de *CBF1* que se observa en *rica4*, por el contrario, no parece ser debido a esa ausencia. Podemos concluir, por tanto, que *RICA4* funciona como regulador negativo del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis* atenuando la inducción de *CBF2* y *CBF3*.

### 3.6.3. *RICA4* atenúa el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas interaccionando con PRC2 para controlar la deposición de la marca represora H3K27me3 en la región cromosómica de *CBF3*

Distintas evidencias experimentales sugieren que la expresión de los CBFs, además de estar regulada a nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional, (Barrero-Gil y Salinas, 2018), también lo está al nivel epigenético. En primer lugar, los datos depositados en la base de datos PSCD (*Plant Chromatin State Database*) indican que, en condiciones control, tanto las regiones codificantes de los tres CBFs como las regiones promotoras de *CBF2* y *CBF3* presentan un enriquecimiento de la marca H3K27me3 (Margueron y Reinberg, 2011). Además, se ha descrito que, en condiciones control, CLF, una subunidad clave de PRC2, se encuentra asociada a la región genómica de los CBFs (Xiao et al., 2017). Numerosos trabajos han demostrado que diferentes lncRNAs de plantas regulan la expresión génica controlando la deposición de marcas epigenéticas, entre ellas H3K27me3 (Lee et al., 2012). Hipotetizamos, por tanto, que *RICA4* podría interaccionar con PRC2, controlando su función y atenuando la inducción de *CBF2* y *CBF3* en respuesta a temperaturas bajas. Esta hipótesis se analizó estudiando la inducción por frío de *CBF2* y *CBF3* en plantas dobles mutantes *clf-28 swn-7* que tienen severamente disminuida la actividad de PRC2 debido a la ausencia de CLF y SWN, dos subunidades esenciales de este complejo (Lafos et al., 2011). Este análisis reveló que, de manera similar a lo que ocurría en plantas *rica4-1*, los niveles de transcritos de *CBF3* se encontraban más altos en el doble mutante *clf-28 swn-7* que en las plantas Col-0 (Figura 23A). La inducción por frío de *CBF2* en *clf-28 swn-7*, sin embargo, era significativamente menor a la de las plantas de genotipo silvestre (Figura 23A). Estos resultados indicaban que PRC2 regula negativamente la inducción de *CBF3*





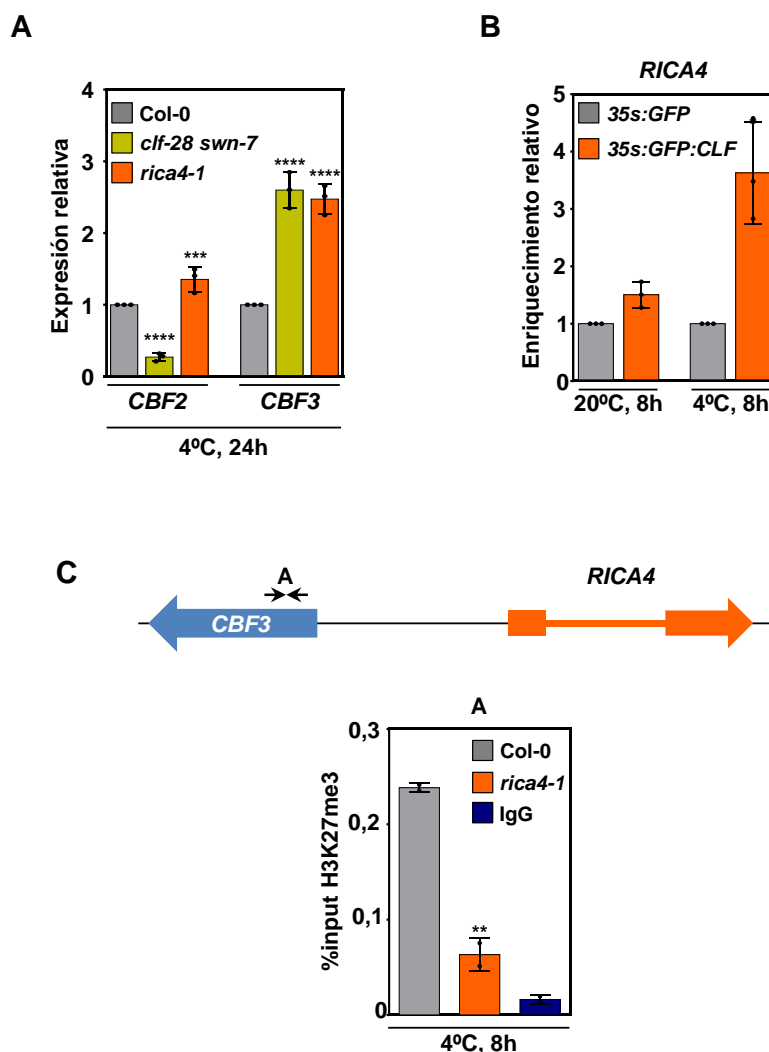
**Figura 22. El transcrito de *RICA4* se requiere para atenuar la expresión de los *CBFs* y el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas .**

(A-B) Análisis de la expresión de *RICA4* (A) y de los genes *CBF1*, *CBF2*, *CBF3* y *GOLS3* (B) en plantas Col-0, *c-rica4-1* L1 y *c-rica4-1* L2 de dos semanas de edad, expuestas a 4°C durante 24h. Los niveles de expresión se cuantificaron mediante qPCR y se relativizaron respecto a los niveles de plantas Col-0 expuestas 4°C. (C, panel izquierdo) Análisis de la tolerancia de plantas Col-0 y *c-rica4-1* de dos semanas de edad, aclimatadas durante 7 días a 4°C y posteriormente sometidas -10°C durante 6h. (C, panel derecho) Fotos representativas de plantas aclimatadas durante una semana a 4°C y posteriormente congeladas a -10°C durante 6h tras una semana de recuperación. En todos los casos, los asteriscos indican diferencias significativas (\*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001, \*\*\*\*P < 0,0001) entre mutantes *rica4-1* y las líneas *c-rica4-1* calculadas mediante una prueba de T de Student. Los puntos representan los valores de tres réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error muestran la desviación estándar.

y positivamente la de *CBF2* en respuesta a las temperaturas bajas. Teniendo en cuenta el papel represor de PRC2, estos resultados sugieren que este complejo controlaría la expresión de *CBF2* de manera indirecta.

Varios lncRNAs de *Arabidopsis* son capaces de interactuar con CLF para dirigir a PRC2 hacia sus genes diana (Heo y Sung, 2011; Kim y Sung, 2017; Wu et al., 2018) por lo que decidimos investigar si este también podía ser el mecanismo de acción de *RICA4*. Para determinar si *RICA4* interactuaba con CLF, se llevaron a cabo experimentos de RIP utilizando plantas mutantes *clf50 clf16* que expresaban la construcción *35S::GFP::CLF* (Schubert et al., 2006) de tres semanas de edad, crecidas en condiciones control y expuestas a 4°C durante 8h. Como control de la especificidad de la interacción también se utilizaron plantas Col-0 que contenían la construcción *35S::GFP*. La cuantificación de los niveles de *RICA4* en la fracción inmunoprecipitada, mediante qPCR, puso de manifiesto que únicamente existía enriquecimiento en las muestras de plantas expuestas a 4°C que expresaban la proteína GFP-CLF (Figura 23B), confirmando que *RICA4* interactúa de manera específica con CLF en respuesta a las temperaturas bajas.

A continuación, nos planteamos si la interacción de *RICA4* con CLF era necesaria para que el complejo PRC2 llevara a cabo su función en la región cromosómica de *CBF3*. Con este objetivo, se analizaron los niveles de la marca H3K27me3 en esta región, en plantas Col-0 y *rica4-1* expuestas 8h a 4°C, mediante experimentos de ChIP, utilizando un anticuerpo específico frente a H3K27me3. Posteriormente, el DNA genómico de la región de *CBF3* que coinmunoprecipitaba con H3K27me3 se cuantificó por qPCR. Como control negativo del experimento se cuantificó el DNA genómico de *CBF3* que coinmunoprecipitaba con un anticuerpo anti IgG. De este modo, se pudo determinar que existía una menor cantidad de DNA genómico precipitado perteneciente a *CBF3* en plantas *rica4-1* que en plantas de genotipo silvestre, lo que evidenciaba un descenso significativo en los niveles de la marca H3K27me3 en esta región, en ausencia de *RICA4* (Figura 23C). Todos estos resultados indicaban que *RICA4* regularía negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis* interactuando con el complejo PRC2 para controlar la deposición de la marca H3K27me3 en la región cromosómica de *CBF3* reprimiendo así su expresión.



**Figura 23. La interacción entre *RICA4* y *CLF* es necesaria para que *PRC2* pueda depositar la marca *H3K27me3* en la región cromosómica de *CBF3*.**

**(A)** Análisis de la expresión de *CBF2* y *CBF3* en plantas Col-0, *clf-28 swm-7* y *rica4-1* de dos semanas expuestas a 4°C durante 24h. Los niveles de expresión se relativizaron respecto a los niveles en plantas Col-0. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $***P < 0,001$   $****P < 0,0001$ ) entre plantas Col-0 y los mutantes analizados, calculadas mediante una prueba de T de Student. **(B)** Ensayo de RIP con plantas *35S::GFP::CLF* de dos semanas crecidas a 20°C, y expuestas a 4°C durante 8h. Como control de especificidad se utilizaron plantas que contenían la construcción *35S::GFP*. Se cuantificaron los niveles de *RICA4* presentes en las fracciones inmunoprecipitadas en condiciones control y de frío mediante qPCR. Los niveles de *RICA4* presentes en la fracción inmunoprecipitada de plantas *35S::GFP::CLF* se relativizaron a los niveles existentes en la fracción inmunoprecipitada de plantas control. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $*P < 0,05$ ,  $****P < 0,0001$ ) entre plantas con la construcción *35S::GFP::CLF* y plantas control, calculadas mediante una prueba de T de Student. **(C, panel superior)** Representación esquemática de la región genómica de *RICA4* y *CBF3*. Las flechas negras indican la pareja de oligonucleótidos que se utilizó para la amplificación del DNA genómico precipitado en los ensayos de ChIP. **(C, panel inferior)** Experimentos de ChIP con plantas Col-0, y *rica4-1* de dos semanas expuestas a 4°C durante 8h. Los niveles de DNA genómico amplificado por qPCR en la fracción inmunoprecipitada con el anticuerpo anti H3K27me3 se normalizaron respecto a los niveles de DNA genómico amplificados en el input. Como control de la especificidad se utilizó el anticuerpo anti IgG. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $**P < 0,01$ ) entre los mutantes *rica4-1* y plantas control calculadas, mediante una prueba de T de Student. En todos los casos, los puntos representan los valores de réplicas biológicas independientes, las barras coloreadas indican la media, y las barras de error muestran la desviación estándar.



#### **4. DISCUSIÓN**



## **4. DISCUSIÓN**

### **4.1. Los RNAs largos no codificantes como nuevos reguladores del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis**

Los lncRNAs se han destapado en los últimos años como reguladores importantes de la expresión génica en eucariotas. Además, diferentes trabajos han identificado numerosos lncRNAs de plantas, incluyendo Arabidopsis, cuya expresión está regulada en respuesta a situaciones de estrés abiótico (Di et al., 2014; Liu et al., 2012; Song et al., 2015, 2016b; Wang et al., 2019; Wu et al., 2019). Sin embargo, a día de hoy, apenas se conoce el papel que juegan esos lncRNAs en dichas respuestas. De hecho, únicamente se han caracterizado funcionalmente tres lncRNAs. *IPS1*, implicado en la respuesta de la planta al estrés producido por la carencia de fosfato (Franco-Zorrilla et al., 2007), *DRIR* que media en la respuesta al estrés salino y osmótico (Qin et al., 2017), y *SVK* que actúa como regulador negativo del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas (Kindgren, 2018). En esta tesis, se han identificado y caracterizado molecular y funcionalmente cuatro lncRNAs de Arabidopsis (*RICA1-4*) cuya expresión responde a una disminución de la temperatura y que regulan la tolerancia de esta especie a las temperaturas bajas a través de distintitos mecanismos. Se ha determinado que *RICA1* es un regulador positivo del proceso de aclimatación y que actúa a través de una vía diferente a las descritas hasta ahora, que *RICA2* regula negativamente la tolerancia constitutiva a la congelación reprimiendo la expresión génica mediada por NPR1 y, por último, que *RICA3* y *RICA4* atenúan la inducción por frío de *CBF2* y *CBF3*, respectivamente, para modular el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. Resulta llamativo que, de los cuatro lncRNAs caracterizados en este trabajo, tres sean reguladores negativos del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. El proceso de aclimatación es un proceso complejo que conlleva multitud de cambios, tanto a nivel fisiológico como bioquímico, y que se encuentra altamente regulado por diferentes mecanismos. En esta regulación, son tan importantes los mecanismos de activación, como los de represión. De hecho, como se ha comentado en la Introducción, en los últimos años no solo se ha descrito un número importante de activadores de este proceso sino también un buen número de reguladores negativos que tienen como misión impedir que el proceso se active cuando no se dan las condiciones o que se produzcan con la intensidad y duración inadecuadas (Agarwal et al., 2006; Seo et al., 2009). Es también de destacar que ninguno de los *RICA* está implicado en la respuesta de Arabidopsis al estrés salino o al estrés hídrico, dos tipos de estreses abióticos muy relacionados, tanto al nivel fisiológico como al molecular, con las temperaturas bajas (Thomashow, 1999), lo que sugiere que en plantas el papel regulador de los lncRNAs es muy específico. Los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran el papel esencial que juegan los lncRNAs en el control de la respuesta respuesta de las plantas a las temperaturas bajas. La variedad de mecanismos

moleculares a través de los cuales actúan resalta su versatilidad y capacidad para regular, de manera muy precisa, procesos fisiológicos tan complejos como la aclimatación a las temperaturas bajas.

#### **4.2. *RICA1* regula positivamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis a través de una vía de señalización independiente a las descritas hasta ahora**

*RICA1* es un lncRNA que se encuentra localizado en el citoplasma, su expresión se induce por frío a tiempos largos, y actúa regulando positivamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis. Así, la sobreexpresión de este lncRNA da lugar a un aumento en la capacidad de aclimatación de Arabidopsis, mientras que su ausencia provoca una disminución. *RICA1* resultó ser idéntico a *ath-eTM166*, un posible eTM que se ha propuesto que podría interactuar con el miRNA166, controlando sus niveles (Wu et al., 2013). El hecho de que *RICA1* se acumule en el citoplasma es coherente con su posible función como eTM, ya que los miRNAs llevan a cabo su actividad principalmente en el citoplasma (Ding et al., 2012; Leung, 2015). La degradación de mensajeros vía miRNAs parece tener un papel relevante en la modulación de la respuesta al estrés producido por las temperaturas bajas (Liu et al., 2008; Zhou et al., 2008). De hecho, se han descrito miRNAs que regulan, tanto positivamente (miRNA394) (Song et al., 2016a) como negativamente (miRNA165 y miRNA166) (Yan et al., 2016), dicha respuesta en Arabidopsis. Wu et al., (2013) demostraron que la sobreexpresión en condiciones control del motivo de *RICA1/ath-eTM166* que podía interactuar con el miRNA166 ocasionaba un aumento en los niveles de tres genes diana de este miRNA, *PHB*, *ICU4* y *PHV*. Además, recientemente se ha publicado que *PHB* controla la expresión de genes implicados en la síntesis y percepción del ABA en condiciones control, lo que podría explicar el papel de *RICA1/ath-eTM166* en la regulación del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas (Yan et al., 2016). Los análisis de expresión realizados en esta Tesis, sin embargo, han demostrado que las plantas con niveles alterados de *RICA1/ath-eTM166* no presentan diferencias significativas con respecto a las plantas Col-0 en los niveles de expresión de ninguno de los genes diana del miRNA166 a 4°C. Estos resultados podrían ser debidos, simplemente, a que los genes diana del miRNA166 sean diferentes en condiciones control y en frío. En este sentido, recientemente se ha demostrado que las variaciones en las concentraciones de los miRNAs pueden dar lugar a cambios en la especificidad de sus genes dianas (Brancati y Großhans, 2018). Teniendo en cuenta que la exposición a temperaturas bajas aumenta los niveles de expresión del miRNA166 (Zhou et al., 2008) es factible que la exposición a 4°C altere la especificidad de sus blancos. Por otro lado, no se puede descartar que, en respuesta a temperaturas bajas, pueda secuestrar otros miRNAs



además del miRNA166, o incluso pueda tener otra función diferente a la de eTM. Por ejemplo, en animales el lncRNA *HOTAIR*, además de secuestrar al miRNA130a en tejidos tumorales, también funciona como anclaje del PRC2 al DNA para modular la expresión génica en otros tejidos (Hajjari y Salavaty, 2015).

Por otro lado, los niveles de inducción por frío de genes marcadores de las principales vías de señalización descritas que median en el proceso de aclimatación, como *KIN1* y *COR15A* de la vía de los CBFs (Jia et al., 2016; Zhao et al., 2016), *CHS* y *CHI* de la vía de HY5 (Catalá et al., 2011), *RAB18* de la vía de ABA (Lang et al., 1994) y *PR1* y *PR2* de la vía de NPR1 (Olate et al., 2018) en plantas deficientes o sobreexpresoras de *RICA1*, tampoco presentan diferencias significativas con respecto a los niveles en las plantas de genotipo silvestre. A partir de todos estos resultados, proponemos que la función de *RICA1* como regulador positivo del proceso de aclimatación debe de estar mediado a través de una vía de señalización independiente a las identificadas hasta ahora. La identificación de los miRNAs con los que interacciona *RICA1* en condiciones de frío, y la de sus correspondientes genes diana contribuiría, de manera decisiva, a desvelar esa vía de señalización.

#### **4.3. *RICA2* regula negativamente la tolerancia constitutiva de Arabidopsis a las heladas controlando parcialmente la expresión génica mediada por NPR1 en respuesta a las temperaturas bajas**

Los resultados demuestran que los niveles de transcritos de *RICA2* disminuyen rápidamente en respuesta a 4°C, lo cual es coherente con su papel como regulador negativo de la tolerancia constitutiva de Arabidopsis a la congelación. *RICA2*, sin embargo, no está implicado en el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. Este hecho, junto con su patrón de expresión, sugiere que actuaría frenando la puesta en marcha de los mecanismos de adaptación a frío en condiciones control. *RICA2*, por tanto, aseguraría que los mecanismos de respuesta a las temperaturas bajas no se activasen en ausencia de frío. El análisis de la expresión génica durante el proceso de aclimatación en plantas con niveles reducidos de *RICA2* ha puesto de manifiesto que este lncRNA regula negativamente y de manera específica, la inducción de genes mediados por NPR1. *RICA2*, en cambio, no parece afectar directamente a la expresión de este factor de transcripción, indicando que actuaría aguas abajo de NPR1. A 4°C, NPR1 interacciona con varios factores de transcripción para inducir la expresión de diferentes genes durante el proceso de aclimatación (Olate et al., 2018). Por un lado, interacciona con los miembros de la familia de factores de transcripción HSF1As, induciendo la expresión de genes como *HSP101*, *HSP70* y *FES1A* (Olate et al., 2018). Por otro lado, interacciona con otros factores no identificados hasta el momento para inducir la expresión de genes

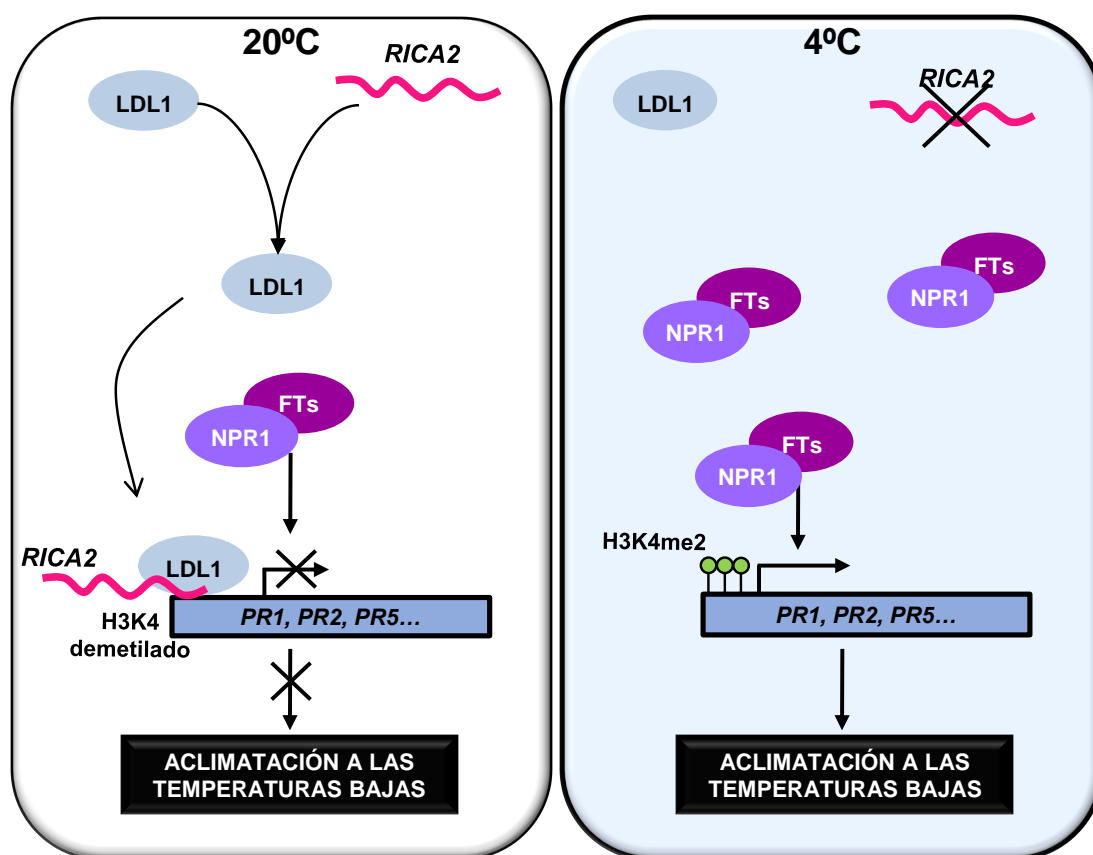
como *PR1*, *PR2*, *PR5*, *WRKY46* y *AT1G35710* (Olate et al., 2018). Los análisis de expresión en los mutantes deficientes de *RICA2* demuestran que este lncRNA controla, únicamente, la expresión de este último grupo de genes. Por tanto, *RICA2* atenuaría, específicamente, la expresión génica mediada por NPR1 que es independiente de los factores de transcripción HSFA1s.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la expresión de varios de los genes diana de *RICA2*, como por ejemplo *PR1*, *PR2* o *WRKY46*, está controlada por los niveles de metilación de H3K4 en sus promotores (Alvarez-Venegas et al., 2007; Berr et al., 2015; Mosher et al., 2006; Shen et al., 2014; Wang et al., 2013). La di- o trimetilación de H3K4 en los promotores de estos genes está asociada con su activación transcripcional, mientras que la pérdida de estos grupos metilo se corresponde con un estado transcripcionalmente inactivo (Shi et al., 2004). Es conocido, desde hace tiempo, que las demetilinasas son las enzimas responsables de retirar los grupo metilo de H3K4 (Shi et al., 2004). En animales, la demetilasa LSD1 necesita interaccionar con un lncRNA denominado *HOTAIR* para ser dirigido hacia los promotores de sus genes diana y allí demetilar los residuos H3K4me2 (Kalwa et al., 2016; Tsai et al., 2010). Los resultados de esta Tesis han revelado que los genes diana de *RICA2* también lo son de LDL1, una demetilasa de *Arabidopsis* homóloga a LSD1 (Jiang et al., 2007). Coherentemente, el mutante *ldl1*, muestra incrementada su tolerancia constitutiva a la congelación,

Siguiendo el modelo de *HOTAIR*, y teniendo en cuenta su localización nuclear, proponemos que, en condiciones control *RICA2* podría actuar interaccionando con LDL1 para dirigirla hacia las regiones promotoras de los genes cuya expresión génica está mediada por NPR1 de manera independiente a los factores HSF1As, asegurando la metilación de H3K4 en esas regiones (Figura 24). En respuesta a temperaturas bajas la expresión de *RICA2* disminuiría evitando la acción LDL1 sobre los promotores de sus genes diana. La deslocalización de LDL1 permitiría la expresión de estos genes y el correcto desarrollo del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas (Figura 24).

#### **4.4. *RICA3* atenúa la inducción por frío de *CBF2* a través de la vía RdDM para modular el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas**

Los CBFs constituyen un componente central de los mecanismos de regulación del proceso de aclimatación (Barrero-Gil y Salinas, 2018), regulando la expresión de más de 400 genes inducibles por temperaturas bajas (Jia et al., 2016; Zhao et al., 2016). En consonancia con su papel central, su expresión está fuertemente regulada a diferentes niveles (Barrero-Gil y Salinas, 2018; Shi et al., 2018). En esta Tesis se demuestra que *RICA3* se transcribe en el promotor de *CBF2* y regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas atenuando la inducción por frío de este *CBF* a



**Figura 24. Modelo del mecanismo de actuación propuesto para *RICA2* en la regulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación.**

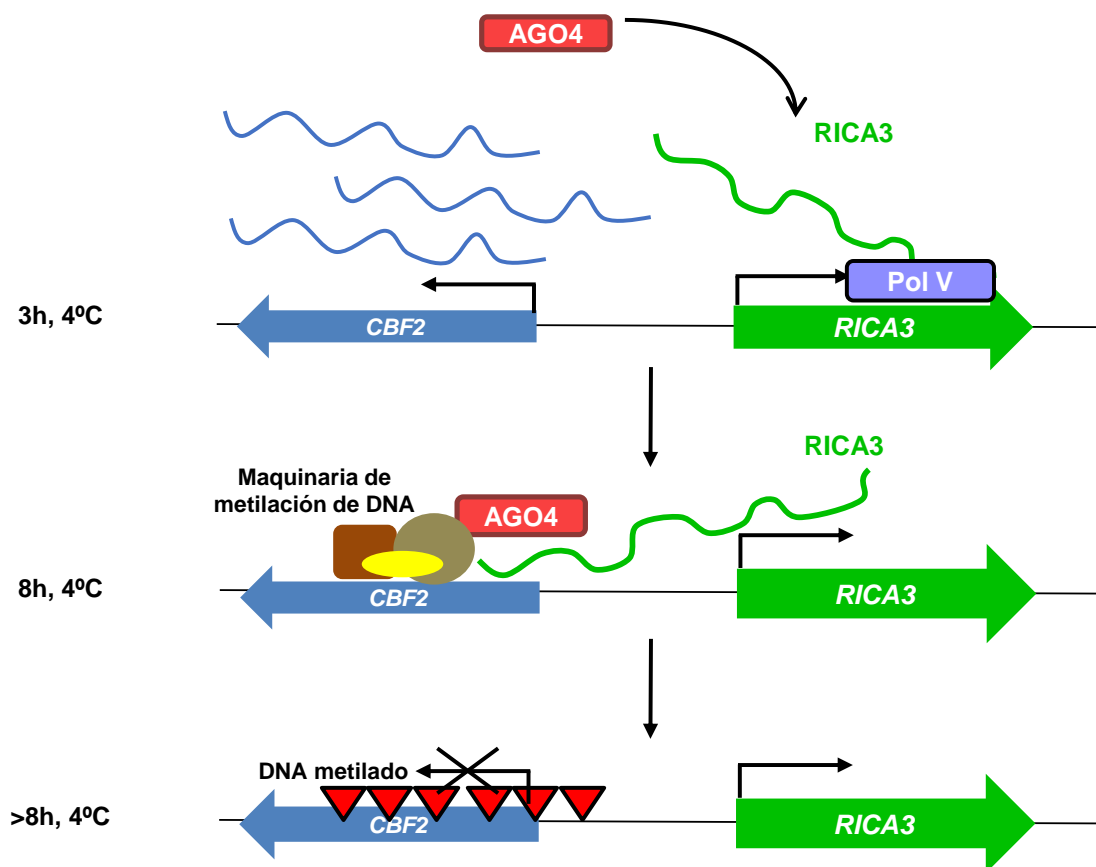
A 20°C, *RICA2* interaccionaría con LDL1 para dirigirlo hacia la región promotora de genes de la vía de NPR1 independientes de los HSF1As para asegurar su demetilación y por tanto, el bloqueo de su transcripción. En respuesta a temperaturas bajas, la expresión de *RICA2* disminuiría impidiendo la actuación de LDL1 en los promotores de sus blancos. La deslocalización de LDL1 permitiría la entrada en acción de los mecanismos de activación de la transcripción de estos genes, como metilasas o el propio NPR1, activando así el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

tiempos largos. El máximo de inducción de *RICA3* coincide con el descenso en los niveles de mensajeros de *CBF2*, indicando que este lncRNA contribuye la inhibición de la expresión de *CBF2* tras su inducción en respuesta a frío. *RICA3* actúa específicamente sobre *CBF2* sin alterar la expresión de *CBF1* y *CBF3*, lo que demuestra, una vez más, que la expresión de los *CBFs* está regulada de manera independiente por diferentes mecanismos. *RICA3* representa un nuevo regulador de *CBF2*, un gen que parece tener un mayor impacto en el proceso de aclimatación que *CBF1* y *CBF3* (Novillo et al., 2004; Zhao et al., 2016). De hecho, la ausencia de *CBF2* origina un descenso en la capacidad de aclimatación, a diferencia de la deficiencia en *CBF1* o *CBF3* que no tiene ninguna consecuencia en el desarrollo de este proceso (Jia et al., 2016; Zhao et al., 2016). Además, aunque todavía se desconoce en qué radica su singularidad, estudios de variación natural en *Arabidopsis* han puesto de manifiesto que *CBF2* tiene un valor adaptativo que no tienen los otros dos *CBFs* (Alonso-Blanco et al., 2005).

La metilación del DNA vía RdDM es un mecanismo de silenciamiento epigenético exclusivo de plantas que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad del genoma mediante el silenciamiento de transposones y de secuencias repetidas (Matzke et al., 2015). En los últimos años se ha revelado que esta vía participa en el control de la expresión génica en la respuesta de las plantas a estrés biótico (Matzke et al., 2015). Así, la expresión de algunos genes implicados en la señalización de la respuesta a patógenos, como por ejemplo *BIR1*, *WRKY22* y *RMG1*, parece estar regulada a través de esta vía (Yu et al., 2013; Guzmán-Benito et al., 2019). Curiosamente, hasta ahora, no se han reportado evidencias claras que demuestren que la vía RdDM actúa regulando la expresión génica en respuesta a estrés abiótico. Se ha propuesto que la actividad de AGO4, una proteína perteneciente a la maquinaria de silenciamiento génico mediado por la vía de RdDM es dependiente de dos lncRNAs (Wierzbicki et al., 2009; Wierzbicki, 2012). Uno de ellos, transcrito por la RNA polimerasa IV, es precursor para la biosíntesis de siRNA. Estos pequeños RNAs interaccionan con AGO4 y le guían por complementariedad de secuencia, hacia la región donde se está transcribiendo otro lncRNA, en este caso por la RNA polimerasa V. La unión de AGO4 a este lncRNA desencadena el ensamblaje del resto de la maquinaria de metilación del DNA sobre esta región. (Wierzbicki et al., 2009; Wierzbicki, 2012). Experimentos de inmunoprecipitación de la proteína AGO4, han permitido identificar multitud de lncRNAs, transcritos por la polimerasa V, que podrían participar en el silenciamiento mediado por RdDM (Au et al., 2017), aunque nunca se ha demostrado si la interacción entre los lncRNAs y AGO4 es necesaria para el silenciamiento de los genes diana. Nuestros resultados demuestran que *RICA3* es transcrito por la RNA polimerasa V y que interacciona específicamente con la proteína AGO4 a 4°C. Además, los resultados revelaron que la inducción de *CBF2* está controlada negativamente por AGO4. Teniendo en cuenta que recientemente se ha descrito la localización de AGO4 en la región genómica de *CBF2* (Au et al., 2017), todo esto sugiere que *RICA3* podría atenuar la expresión de *CBF2* en respuesta a temperaturas bajas a través de la vía RdDM, y supondría la primera prueba funcional de que la actividad de un lncRNA es necesaria para llevar a cabo el silenciamiento génico a través de esta vía.

En base a los resultados obtenidos en esta Tesis proponemos un modelo para la función de *RICA3* en el control del proceso de aclimatación según el cual la bajada de temperaturas promovería la inducción de *CBF2*, alcanzando un máximo en torno a las 3 horas de exposición a frío. A partir de este momento, se activaría la expresión de *RICA3* por la polimerasa V y el transcrito resultante interaccionaría con AGO4. La interacción entre *RICA3* y AGO4 en la región genómica de *CBF2* ocasionaría que la maquinaria de metilación de DNA se ensamblara en esta región concreta, ocasionando la metilación del

DNA y, por tanto, la represión de la expresión de *CBF2*. para que los niveles de transcritos recuperen los valores que tenían en condiciones control (Figura 25).



**Figura 25. Modelo del mecanismo de actuación propuesto para *RICA3* en la regulación de la expresión de *CBF2* durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.**

A las 3 horas de exposición a 4°C *CBF2* alcanzaría su máximo de expresión y la polimerasa V transcribiría a *RICA3*. A partir de las 8h, *RICA3* interactuaría con AGO4 en la región genómica de *CBF2*. La localización de AGO4 en esta zona desencadenaría el ensamblaje de la maquinaria de metilación de DNA dando lugar a la metilación, y por consiguiente, a la represión de la transcripción de *CBF2*.

#### 4.5. *RICA4* reprime la inducción de *CBF3* en respuesta a temperaturas bajas a través de PRC2 asegurando el correcto desarrollo del proceso de aclimatación

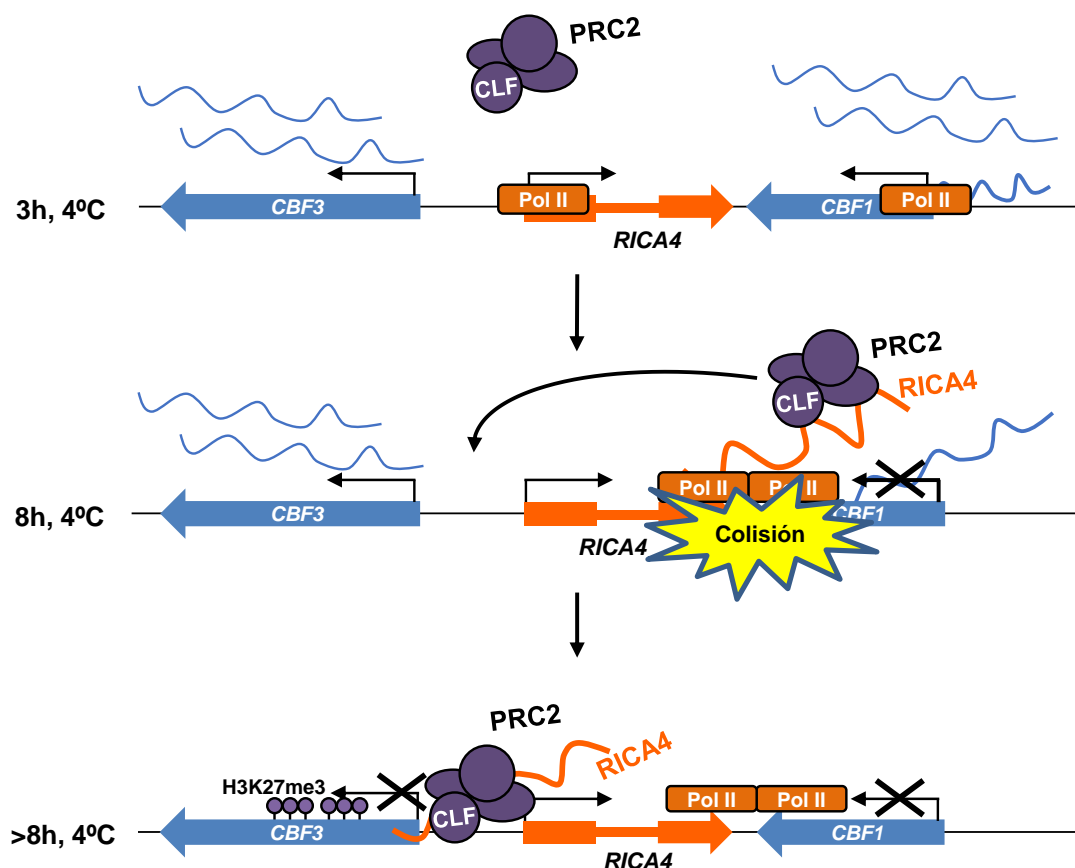
De manera similar a *RICA3*, *RICA4* también regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas atenuando la inducción por frío de los *CBFs* a tiempos largos y, por consiguiente, de sus genes diana. Durante el transcurso de esta tesis, Kindgren et al. (2018) identificaron un lncRNA al que denominaron *SVK*, que resultó ser idéntico a *RICA4*. La caracterización molecular y funcional descrita por Kindgren et al. (2018) coincide con los resultados obtenidos en esta tesis, confirmando el papel de *RICA4/SVK* como regulador negativo del proceso de aclimatación, atenuando la inducción de *CBF1*. Estos autores proponen que *RICA4/SVK* inhibe específicamente la inducción de *CBF1* a través de un mecanismo de colisión de polimerasas (Kindgren,

2018). En este mecanismo no intervendría directamente la molécula de RNA de *RICA4/SVK*, sino que la inhibición se produciría por la colisión de las polimerasas que transcriben a *RICA4/SVK* y a *CBF1* de forma simultánea y de manera convergente. Nuestros resultados demuestran, sin embargo, que *RICA4/SVK* controla el proceso de aclimatación por otros mecanismos adicionales que implicaría además de *CBF1*, *CBF2* y *CBF3*. En efecto, la caracterización funcional de este lncRNA nos ha permitido demostrar que *RICA4/SVK* atenúa la inducción tanto de *CBF1* como de *CBF2* y *CBF3* en respuesta a frío. Dada la distancia que hay entre *CBF2* y *CBF3* a *RICA4/SVK* y al sentido divergente de su transcripción, la regulación de estos genes por parte del lncRNA no podría explicarse a través del mecanismo de colisión co-transcripcional. De acuerdo con esta predicción teórica, los análisis de complementación del mutante *rica4-1* demuestran que, efectivamente, *RICA4/SVK* regula en *trans* la inducción de *CBF2* y *CBF3*, pero no la de *CBF1*. Estos resultados confirman la conclusión de Kindgren et al., (2018) sobre el papel de *RICA4/SVK* en el control de la expresión de *CBF1*, e indican que la inhibición de la inducción de *CBF2* y *CBF3* se llevaría a cabo por medio de mecanismos diferentes al de la colisión co-transcripcional.

Se ha sugerido que CLF, una subunidad clave del PRC2 (Schubert et al., 2006), se encuentra asociada a distintas zonas de la región genómica de *CBF2* y *CBF3* (Xiao et al., 2017). Los ensayos de expresión en *clf-28 swn-7*, un mutante con la actividad de PRC2 severamente comprometida (Lafos et al., 2011), confirmaron que la inducción de *CBF3* en condiciones de frío está regulada negativamente por este complejo. Sorprendentemente, PRC2 regula positivamente la inducción de *CBF2* lo cual, dado el carácter de este complejo como regulador negativo, sugiere que dicha regulación la lleva a cabo a través de un mecanismo indirecto. Coherentemente con su localización nuclear, los resultados de inmunoprecipitación de RNA y cromatina han revelado que *RICA4* interacciona con CLF y que, además, la actividad de PRC2 en la región de *CBF3* depende de este lncRNA. Hasta el momento, solamente se han descrito 3 lncRNAs de *Arabidopsis* que posean la capacidad de unirse al complejo PRC2 para llevar a cabo el silenciamiento génico: *AG-incRNA4*, que controla la expresión de *AG* en el desarrollo de la flor (Wu et al., 2018) y *COLDAIR* y *COLDWRAP* que inhiben la expresión de *FLC* durante el proceso de vernalización (Heo y Sung, 2011; Kim y Sung, 2017). Dado que en animales se ha descrito que los lncRNAs son capaces de guiar a PRC2 hacia sus genes diana (Lee et al., 2012), *RICA4* también podría dirigir a PRC2 hacia la región genómica de *CBF3* ocasionando su represión transcripcional.

*RICA4*, por lo tanto, controlaría el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas a través de la represión de *CBF1* mediante la colisión co-transcripcional de las polimerasas y la represión epigenética de *CBF3*. La capacidad para regular varios *CBFs* mediante mecanismos distintos permitiría a *RICA4* modular de manera muy precisa e

independiente la expresión de *CBF1* y *CBF3*. Aunque es un mecanismo aún muy escaso, en animales ya se han descrito lncRNAs que operan a través de varios mecanismos diferentes. Así, como ya se mencionó anteriormente, el lncRNA *HOTAIR* puede actuar como un eTM, secuestrando miRNAs, y como andamiaje para la maquinaria de silenciamiento epigenético (Hajjari y Salavaty, 2015). Hay que resaltar, sin embargo, que hasta el momento no se había descrito ningún lncRNA de plantas que actuara a través de varios mecanismos diferentes.



**Figura 26. Modelo del mecanismo de actuación propuesto para *RICA4* en la regulación de la expresión de *CBF1* y *CBF3* durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.**

En respuesta a las temperaturas bajas se activaría rápidamente la inducción de *CBF3* y *CBF1* alcanzando sus máximos en torno a las tres horas de exposición. A partir de este momento comenzaría la inducción de *RICA4*, bloqueando la expresión de *CBF1* por el choque de las polimerasas. Los transcritos de *RICA4* generados se unirían a la subunidad CLF de PRC2 y lo guiarían hacia la región cromosómica de *CBF3*. Aquí, el PRC2 llevaría a cabo la deposición de la marca H3K27me3 causando la atenuación de la expresión de *CBF3*.

El conjunto de resultados obtenidos nos permite proponer que, en respuesta a las temperaturas bajas, se activaría rápidamente la transcripción de *CBF1* y *CBF3* alcanzando unos máximos en torno a las tres horas de exposición. A partir de este momento, se produciría la inducción de *RICA4*, que provocaría el silenciamiento de *CBF1* como consecuencia del choque de las polimerasas correspondientes. Por otro

lado, los transcritos de *RICA4* interaccionarían con PRC2 y lo dirigirían hacia la región genómica de *CBF3*. Aquí, el PRC2 llevaría a cabo la deposición de la marca H3K27me3, inhibiendo la expresión de *CBF3* (Figura 26). De este modo, *RICA4* aseguraría que los niveles de transcritos de *CBF1* y *CBF3* vuelven a sus niveles de inicio y que el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas se desarrolla adecuadamente.







## **5. CONCLUSIONES**



### **5. CONCLUSIONES**

1. Los lncRNAs *RICAs* son nuevos reguladores del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis
2. *RICA1* regula positivamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas a través de una vía independiente de las ya descritas
3. *RICA2* modula la tolerancia constitutiva a la congelación bloqueando parte de la vía de señalización de NPR1
4. *RICA3* regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas a través del silenciamiento de *CBF2* por la vía RdDM
5. *RICA4* modula la actividad de PRC2 atenuando la expresión de *CBF3* en respuesta a las temperaturas bajas, regulando negativamente el proceso de aclimatación



## **6. BIBLIOGRAFÍA**





**6. Bibliografía**

- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., y Genschik, P.** (2008). The Cold-Inducible CBF1 Factor-Dependent Signaling Pathway Modulates the Accumulation of the Growth-Repressing DELLA Proteins via Its Effect on Gibberellin Metabolism. *PLANT CELL ONLINE* **20**: 2117-2129.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C.-H., Fujii, H., Zheng, X., y Zhu, J.-K.** (2006). A R2R3 Type MYB Transcription Factor Is Involved in the Cold Regulation of CBF Genes and in Acquired Freezing Tolerance. *J. Biol. Chem.* **281**: 37636-37645.
- Airaki, M., Leterrier, M., Mateos, R.M., Valderrama, R., Chaki, M., Barroso, J.B., del Río, L.A., Palma, J.M., y Corpas, F.J.** (2012). Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant, Cell Environ.*
- Alonso-Blanco, C., Gomez-Mena, C., Llorente, F., Koornneef, M., Salinas, J., y Martínez-Zapater, J.M.** (2005). Genetic and molecular analyses of natural variation indicate CBF2 as a candidate gene for underlying a freezing tolerance quantitative trait locus in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **139**: 1304-1312.
- Alvarez-Venegas, R., Abdallat, A. Al, Guo, M., Alfano, J.R., y Avramova, Z.** (2007). Epigenetic control of a transcription factor at the cross section of two antagonistic pathways. *Epigenetics* **2**: 106-113.
- Ariel, F., Jegu, T., Latrasse, D., Romero-Barrios, N., Christ, A., Benhamed, M., y Crespi, M.** (2014). Noncoding transcription by alternative rna polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Mol. Cell* **55**: 383-396.
- Ariel, F., Romero-Barrios, N., Jegu, T., Benhamed, M., y Crespi, M.** (2015). Battles and hijacks: noncoding transcription in plants. *Trends Plant Sci.* **20**: 362-371.
- Au, P.C.K., Dennis, E.S., y Wang, M.B.** (2017). Analysis of argonaute 4-associated long non-coding RNA in arabidopsis thaliana sheds novel insights into gene regulation through RNA-directed DNA methylation. *Genes (Basel)*. **8**.
- Baier, M., Bittner, A., Prescher, A., y van Buer, J.** (2018). Preparing plants for improved cold tolerance by priming. *Plant. Cell Environ.*
- Baker, S.S., Wilhelm, K.S., y Thomashow, M.F.** (1994). The 5'-region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.* **24**: 701-13.
- Bardou, F., Ariel, F., Simpson, C.G., Romero-Barrios, N., Laporte, P., Balzergue, S., Brown, J.W.S.S., y Crespi, M.** (2014). Long Noncoding RNA Modulates Alternative Splicing Regulators in Arabidopsis. *Dev. Cell* **30**: 166-176.
- Barrero-Gil, J. y Salinas, J.** (2018). Gene regulatory networks mediating cold acclimation: The CBF pathway. *En Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Beltran, M., Puig, I., Pena, C., Garcia, J.M., Alvarez, A.B., Pena, R., Bonilla, F., y de Herreros, A.G.** (2008). A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev.* **22**: 756-769.
- Berr, A., Shafiq, S., Pinon, V., Dong, A., y Shen, W.-H.** (2015). The trxG family histone methyltransferase SET DOMAIN GROUP 26 promotes flowering via a distinctive genetic pathway. *Plant J.* **81**: 316-328.
- Boque-Sastre, R., Soler, M., Oliveira-Mateos, C., Portela, A., Moutinho, C., Sayols, S., Villanueva, A., Esteller, M., y Guil, S.** (2015). Head-to-head antisense transcription and R-loop formation promotes transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 5785-5790.
- Bowman, J.L., Drews, G.N., y Meyerowitz, E.M.** (1991). Expression of the Arabidopsis floral homeotic gene AGAMOUS is restricted to specific cell types late in flower development. *Plant Cell* **3**: 749-58.
- Brancati, G. y Großhans, H.** (2018). An interplay of miRNA abundance and target site architecture determines miRNA activity and specificity. *Nucleic Acids Res.* **46**: 3259-3269.
- Cabili, M.N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., y Rinn, J.L.** (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* **25**: 1915-1927.
- Carbonell, A., Takeda, A., Fahlgren, N., Johnson, S.C., Cuperus, J.T., y Carrington, J.C.** (2014). New generation of artificial MicroRNA and synthetic trans-acting small interfering RNA vectors for efficient gene silencing in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **165**: 15-29.
- Catalá, R., Santos, E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Martínez-Zapater, J.M., y Salinas, J.** (2003). Mutations in the Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> Transporter CAX1 Increase CBF/DREB1 Expression and the Cold-Acclimation Response in Arabidopsis. *PLANT CELL ONLINE*.
- Catalá, R., Lopez-Cobollo, R., Mar Castellano, M., Angosto, T., Alonso, J.M., Ecker, J.R., y Salinas, J.** (2014). The Arabidopsis 14-3-3 Protein RARE COLD INDUCIBLE 1A Links Low-Temperature Response and Ethylene Biosynthesis to Regulate Freezing Tolerance and Cold Acclimation. *Plant Cell*.

- Catalá, R., Medina, J., y Salinas, J.** (2011). Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Chen, H.H., Li, P.H., y Brenner, M.L.** (1983). Involvement of abscisic Acid in potato cold acclimation. *Plant Physiol.* **71**: 362-5.
- Chen, T.H.H. y Gusta, L. V.** (1983). Absciscic Acid-Induced Freezing Resistance in Cultured Plant Cells. *PLANT Physiol.* **73**: 71-75.
- Chen, X., Sun, Y., Cai, R., Wang, G., Shu, X., y Pang, W.** (2018). Long noncoding RNA: multiple players in gene expression. *BMB Rep.* **51**: 280-289.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.-H., Hong, X., Agarwal, M., y Zhu, J.-K.** (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes Dev.* **17**: 1043-54.
- Chiou, T.-J.** (2005). Regulation of Phosphate Homeostasis by MicroRNA in Arabidopsis. *PLANT CELL ONLINE.*
- Cooper, D.R., Carter, G., Li, P., Patel, R., Watson, J.E., y Patel, N.A.** (2014). Long Non-Coding RNA NEAT1 Associates with SRp40 to Temporally Regulate PPARgamma2 Splicing during Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. *Genes (Basel).* **5**: 1050-1063.
- Csorba, T., Questa, J.I., Sun, Q., y Dean, C.** (2014). Antisense COOLAIR mediates the coordinated switching of chromatin states at FLC during vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 16160-16165.
- Cui, J., Luan, Y., Jiang, N., Bao, H., y Meng, J.** (2017). Comparative transcriptome analysis between resistant and susceptible tomato allows the identification of lncRNA16397 conferring resistance to *Phytophthora infestans* by co-expressing glutaredoxin. *Plant J.* **89**: 577-589.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., y Scheible, W.-R.** (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **139**: 5-17.
- Derrien, T. et al.** (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* **22**: 1775-1789.
- Desvoyes, B., Vergara, Z., Sequeira-Mendes, J., Madeira, S., y Gutierrez, C.** (2018). A rapid and efficient ChIP protocol to profile chromatin binding proteins and epigenetic modifications in arabidopsis. *En Methods in Molecular Biology (Humana Press, New York, NY)*, pp. 71-82.
- Di, C., Yuan, J., Wu, Y., Li, J., Lin, H., Hu, L., Zhang, T., Qi, Y., Gerstein, M.B., y Guo, Y.** (2014). Characterization of stress-responsive lncRNAs in Arabidopsis thaliana by integrating expression , epigenetic and structural features.: 1-14.
- Ding, J., Lu, Q., Ouyang, Y., Mao, H., Zhang, P., Yao, J., Xu, C., Li, X., Xiao, J., y Zhang, Q.** (2012a). A long noncoding RNA regulates photoperiod-sensitive male sterility, an essential component of hybrid rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 2654-2659.
- Ding, J., Zhou, S., y Guan, J.** (2012b). Finding microRNA targets in plants: current status and perspectives. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **10**: 264-75.
- Djebali, S. et al.** (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**: 101-108.
- Doherty, C.J., Van Buskirk, H.A., Myers, S.J., y Thomashow, M.F.** (2009). Roles for Arabidopsis CAMTA Transcription Factors in Cold-Regulated Gene Expression and Freezing Tolerance. *PLANT CELL ONLINE* **21**: 972-984.
- Dunham, I. et al.** (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.*
- Eremina, M., Unterholzner, S.J., Rathnayake, A.I., Castellanos, M., Khan, M., Kugler, K.G., May, S.T., Mayer, K.F.X., Rozhon, W., y Poppenberger, B.** (2016). Brassinosteroids participate in the control of basal and acquired freezing tolerance of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Franco-Zorrilla, J.M.J.M., Valli, A.A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M.I.M.I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J.A., Paz-Ares, J., Garcia, J.A., y Paz-Ares, J.** (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat. Genet.* **39**: 1033-1037.
- Friml, J. et al.** (2004). A PINOID-Dependent Binary Switch in Apical-Basal PIN Polar Targeting Directs Auxin Efflux. *Science (80-. )*. **306**: 862-865.
- Fu, Z.Q. y Dong, X.** (2013). Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 839-863.
- Gilmour, S.J. y Thomashow, M.F.** (1991). Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* **17**: 1233-40.
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., y Thomashow, M.F.** (1998).

- Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J.* **16**: 433-442.
- Gong, Z., Dong, C.-H., Lee, H., Zhu, J., Xiong, L., Gong, D., Stevenson, B., y Zhu, J.-K. (2005). A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*.
- Gong, Z., Lee, H., Xiong, L., Jagendorf, A., Stevenson, B., y Zhu, J.-K. (2002). RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Guzmán-Benito, I., Donaire, L., Amorim-Silva, V., Vallarino, J.G., Esteban, A., Wierzbicki, A.T., Ruiz-Ferrer, V., y Llave, C. (2019). The immune repressor BIR1 contributes to antiviral defense and undergoes transcriptional and post-transcriptional regulation during viral infections. *New Phytol.* **224**: 421-438.
- Hajjari, M. y Salavaty, A. (2015). HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Cancer Biol. Med.* **12**: 1-9.
- Han, P. et al. (2014). A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature* **514**: 102-106.
- Hansen, T.B., Jensen, T.I., Clausen, B.H., Bramsen, J.B., Finsen, B., Damgaard, C.K., y Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*.
- Hasegawa, Y., Brockdorff, N., Kawano, S., Tsutui, K.K., Tsutui, K.K., y Nakagawa, S. (2010). The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA. *Dev. Cell* **19**: 469-476.
- He, Y., Michaels, S.D., y Amasino, R.M. (2003). Regulation of Flowering Time by Histone Acetylation in *Arabidopsis*. *Science* (80-. ). **302**: 1751-1754.
- Heino, P., Sandman, G., Lång, V., Nordin, K., y Palva, E.T. (1990). Absciscic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* **79**: 801-806.
- Henriques, R., Wang, H., Liu, J., Boix, M., Huang, L.-F.F., y Chua, N.-H.H. (2017). The antiphasic regulatory module comprising CDF5 and its antisense RNA FLORE links the circadian clock to photoperiodic flowering. *New Phytol.* **216**: 854-867.
- Heo, J.B., Lee, Y.-S., y Sung, S. (2013). Epigenetic regulation by long noncoding RNAs in plants. *Chromosome Res.* **21**: 685-93.
- Heo, J.B. y Sung, S. (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* **331**: 76-79.
- Hobson, D.J., Wei, W., Steinmetz, L.M., y Svejstrup, J.Q. (2012). RNA polymerase II collision interrupts convergent transcription. *Mol. Cell* **48**: 365-374.
- Hou, X., Du, Y., Liu, X., Zhang, H., Liu, Y., Yan, N., y Zhang, Z. (2017). Genome-Wide Analysis of Long Non-Coding RNAs in Potato and Their Potential Role in Tuber Sprouting Process. *Int. J. Mol. Sci.* **19**.
- Hu, Y., Jiang, L., Wang, F., y Yu, D. (2013). Jasmonate Regulates the INDUCER OF CBF EXPRESSION-C-REPEAT BINDING FACTOR/DRE BINDING FACTOR1 Cascade and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 2907-2924.
- Hübner, M.R. y Spector, D.L. (2010). Chromatin Dynamics. *Annu. Rev. Biophys.* **39**: 471-489.
- Iyer, M.K. et al. (2015). The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat. Genet.* **47**: 199-208.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., y Thomashow, M.F. (1998). *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* (80-. ). **280**: 104-106.
- Jia, Y., Ding, Y., Shi, Y., Zhang, X., Gong, Z., y Yang, S. (2016). The *cbfs* triple mutants reveal the essential functions of CBFs in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **212**: 345-353.
- Jiang, B., Shi, Y., Zhang, X., Xin, X., Qi, L., Guo, H., Li, J., y Yang, S. (2017). PIF3 is a negative regulator of the CBF pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: E6695-E6702.
- Jiang, D., Kong, N.C., Gu, X., Li, Z., y He, Y. (2011). *Arabidopsis* COMPASS-like complexes mediate histone H3 lysine-4 trimethylation to control floral transition and plant development. *PLoS Genet.* **7**: e1001330.
- Jiang, D., Yang, W., He, Y., y Amasino, R.M. (2007). *Arabidopsis* relatives of the human lysine-specific demethylase1 repress the expression of FWA and FLOWERING LOCUS C and thus promote the floral transition. *Plant Cell*.
- Jiao, F., Pahwa, K., Manning, M., Dochy, N., y Geuten, K. (2019). Cold Induced Antisense Transcription of FLOWERING LOCUS C in Distant Grasses. *Front. Plant Sci.* **10**: 72.

- Kalwa, M. et al.** (2016). The lncRNA HOTAIR impacts on mesenchymal stem cells via triple helix formation. *Nucleic Acids Res.* **44**: 10631.
- Kartha, R. V y Subramanian, S.** (2014). Competing endogenous RNAs (ceRNAs): new entrants to the intricacies of gene regulation. *Front. Genet.* **5**: 8.
- Keily, J., MacGregor, D.R., Smith, R.W., Millar, A.J., Halliday, K.J., y Penfield, S.** (2013). Model selection reveals control of cold signalling by evening-phased components of the plant circadian clock. *Plant J.* **76**: n/a-n/a.
- Kidokoro, S., Yoneda, K., Takasaki, H., Takahashi, F., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2017). Different Cold-Signaling Pathways Function in the Responses to Rapid and Gradual Decreases in Temperature. *Plant Cell* **29**: 760-774.
- Kim, D.-H., Xi, Y., y Sung, S.** (2017). Modular function of long noncoding RNA, COLDAIR, in the vernalization response. *PLoS Genet.* **13**: e1006939.
- Kim, D.-H.H. y Sung, S.** (2017). Vernalization-Triggered Intragenic Chromatin Loop Formation by Long Noncoding RNAs. *Dev. Cell* **40**: 302-312.e4.
- Kim, Y.S., Lee, M., Lee, J.-H., Lee, H.-J., y Park, C.-M.** (2015). The unified ICE–CBF pathway provides a transcriptional feedback control of freezing tolerance during cold acclimation in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **89**: 187-201.
- Kindgren** (2018). Transcriptional read-through of the long non-coding RNA SVALKKA governs plant cold acclimation. *bioRxiv* **77058**: 1-31.
- Knight, H.** (1996). Cold Calcium Signaling in Arabidopsis Involves Two Cellular Pools and a Change in Calcium Signature after Acclimation. *PLANT CELL ONLINE* **8**: 489-503.
- Koster, K.L. y Lynch, D. V.** (1992). Solute Accumulation and Compartmentation during the Cold Acclimation of Puma Rye. *PLANT Physiol.* **98**: 108-113.
- Lafos, M., Kroll, P., Hohenstatt, M.L., Thorpe, F.L., Clarenz, O., y Schubert, D.** (2011). Dynamic regulation of H3K27 trimethylation during Arabidopsis differentiation. *PLoS Genet.* **7**: e1002040.
- Lång, V., Heino, P., y Palva, E.T.** (1989). Low temperature acclimation and treatment with exogenous abscisic acid induce common polypeptides in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 729-734.
- Lang, V., Mantyla, E., Welin, B., Sundberg, B., y Palva, E.T.** (1994). Alterations in Water Status, Endogenous Absciscic Acid Content, and Expression of rab18 Gene during the Development of Freezing Tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* **104**: 1341-1349.
- Lee, C.-M. y Thomashow, M.F.** (2012). Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 15054-9.
- Lee, J.T. et al.** (2012). Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science* **338**: 1435-9.
- Lee, S., Cassone, B.J., Wijeratne, A., Jun, T.-H., Michel, A.P., y Mian, M.A.R.** (2017). Transcriptomic dynamics in soybean near-isogenic lines differing in alleles for an aphid resistance gene, following infestation by soybean aphid biotype 2. *BMC Genomics* **18**: 472.
- Lee, S., Kopp, F., Chang, T.-C., Sataluri, A., Chen, B., Sivakumar, S., Yu, H., Xie, Y., y Mendell, J.T.** (2016). Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. *Cell* **164**: 69-80.
- Leung, A.K.L.** (2015). The Whereabouts of miRNA Actions: Cytoplasm and Beyond. *Trends Cell Biol.* **25**: 601.
- Levitt, J. (Jacob)** (1980). Responses of plants to environmental stresses. Vol. 2, Water, radiation, salt and other stresses (Academic Press).
- Li, H., Ye, K., Shi, Y., Cheng, J., Zhang, X., y Yang, S.** (2017). BZR1 Positively Regulates Freezing Tolerance via CBF-Dependent and CBF-Independent Pathways in Arabidopsis. *Mol. Plant.*
- Li, L. et al.** (2014). Genome-wide discovery and characterization of maize long non-coding RNAs. *Genome Biol.* **15**: R40.
- Lin, J. et al.** (2015). The long noncoding RNA landscape in hypoxic and inflammatory renal epithelial injury. *Am. J. Physiol. Physiol.* **309**: F901-F913.
- Liu, B., Sun, L., Liu, Q., Gong, C., Yao, Y., Lv, X., Lin, L., Yao, H., Su, F., Li, D., Zeng, M., y Song, E.** (2015a). A cytoplasmic NF-kappaB interacting long noncoding RNA blocks IkappaB phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Cell* **27**: 370-381.
- Liu, F., Marquardt, S., Lister, C., Swiezewski, S., y Dean, C.** (2010). Targeted 3' processing of antisense transcripts triggers Arabidopsis FLC chromatin silencing. *Science* **327**: 94-97.

- Liu, H.-H., Tian, X., Li, Y.-J., Wu, C.-A., y Zheng, C.-C.** (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* **14**: 836-43.
- Liu, J., Jung, C., Xu, J., Wang, H., Deng, S., Bernad, L., Arenas-Huertero, C., y Chua, N.-H.** (2012). Genome-wide analysis uncovers regulation of long intergenic noncoding RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 4333-45.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K.** (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1391-406.
- Liu, X., Hao, L., Li, D., Zhu, L., y Hu, S.** (2015). Long Non-coding RNAs and Their Biological Roles in Plants. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **13**: 137-147.
- Liu, Z., Jia, Y., Ding, Y., Shi, Y., Li, Z., Guo, Y., Gong, Z., y Yang, S.** (2017). Plasma Membrane CRPK1-Mediated Phosphorylation of 14-3-3 Proteins Induces Their Nuclear Import to Fine-Tune CBF Signaling during Cold Response. *Mol. Cell* **66**: 117-128.e5.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Llorente, F., Oliveros, J.C., Martínez-Zapater, J.M., y Salinas, J.** (2000). A freezing-sensitive mutant of *Arabidopsis*, *frs1*, is a new *aba3* allele. *Planta*.
- de Lucas, M., Pu, L., Turco, G., Gaudinier, A., Morao, A.K., Harashima, H., Kim, D., Ron, M., Sugimoto, K., Roudier, F., y Brady, S.M.** (2016). Transcriptional Regulation of *Arabidopsis* Polycomb Repressive Complex 2 Coordinates Cell-Type Proliferation and Differentiation. *Plant Cell* **28**: 2616-2631.
- Margueron, R. y Reinberg, D.** (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**: 343-349.
- Marquardt, S., Raitskin, O., Wu, Z., Liu, F., Sun, Q., y Dean, C.** (2014). Functional Consequences of Splicing of the Antisense Transcript COOLAIR on FLC Transcription. *Mol. Cell* **54**: 156-165.
- Mattick, J.S.** (2011). Long noncoding RNAs in cell and developmental biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**: 327.
- Matzke, M.A., Kanno, T., y Matzke, A.J.M.M.** (2015). RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**: 243-267.
- Medina, J., Bagues, M., Terol, J., Pérez-Alonso, M., y Salinas, J.** (1999). The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol.*
- Meller, V.H., Joshi, S.S., y Deshpande, N.** (2015). Modulation of Chromatin by Noncoding RNA. *Annu. Rev. Genet.* **49**: 673-695.
- Meng, L. y Feldman, L.** (2010). A rapid TRIzol-based two-step method for DNA-free RNA extraction from *Arabidopsis* siliques and dry seeds. *Biotechnol. J.*
- Mosher, R.A., Durrant, W.E., Wang, D., Song, J., y Dong, X.** (2006). A comprehensive structure-function analysis of *Arabidopsis* SNI1 defines essential regions and transcriptional repressor activity. *Plant Cell* **18**: 1750-65.
- Nakamichi, N., Kiba, T., Kamioka, M., Suzuki, T., Yamashino, T., Higashiyama, T., Sakakibara, H., y Mizuno, T.** (2012). Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 17123-17128.
- Nakamichi, N., Kusano, M., Fukushima, A., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T., Saito, K., Sakakibara, H., y Mizuno, T.** (2009). Transcript Profiling of an *Arabidopsis* PSEUDO RESPONSE REGULATOR Arrhythmic Triple Mutant Reveals a Role for the Circadian Clock in Cold Stress Response. *Plant Cell Physiol.* **50**: 447-462.
- Nejat, N. y Mantri, N.** (2017). Emerging roles of long non-coding RNAs in plant response to biotic and abiotic stresses. *Crit. Rev. Biotechnol.* **0**: 93-105.
- Novillo, F., Alonso, J.M., Ecker, J.R., y Salinas, J.** (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 3985-3990.
- Novillo, F., Medina, J., y Salinas, J.** (2007). *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 21002-21007.
- Olate, E., Jiménez-Gómez, J.M., Holuigue, L., y Salinas, J.** (2018). NPR1 mediates a novel regulatory pathway in cold acclimation by interacting with HSFA1 factors. *Nat. Plants*.
- Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Costa Nunes, P., Pontes, O., y Pikaard, C.S.** (2005). Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* **120**: 613-22.

- Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., y Deng, X.W.** (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* **405**: 462-466.
- Park, E. y Maquat, L.E.** (2013). Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **4**: 423-435.
- Pelechano, V. y Steinmetz, L.M.** (2013). Gene regulation by antisense transcription. *Nat. Rev. Genet.* **14**: 880-893.
- Plieth, C., Hansen, U.P., Knight, H., y Knight, M.R.** (1999). Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *Plant J.* **18**: 491-7.
- Pombo, A. y Dillon, N.** (2015). Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 245-257.
- Pontes, O., Li, C.F., Costa Nunes, P., Haag, J., Ream, T., Vitins, A., Jacobsen, S.E., y Pikaard, C.S.** (2006). The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell* **126**: 79-92.
- Popescu, S.C., Popescu, G. V., Bachan, S., Zhang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., y Dinesh-Kumar, S.P.** (2009). MAPK target networks in Arabidopsis thaliana revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev.* **23**: 80-92.
- Postepska-Igielska, A., Giwojna, A., Gasri-Plotnitsky, L., Schmitt, N., Dold, A., Ginsberg, D., y Grummt, I.** (2015). LncRNA Khps1 Regulates Expression of the Proto-oncogene SPHK1 via Triplex-Mediated Changes in Chromatin Structure. *Mol. Cell* **60**: 626-636.
- Qin, T., Zhao, H., Cui, P., Albeshier, N., y Xiong, L.** (2017). A Nucleus-localized Long Non-Coding RNA Enhances Drought and Salt Stress Tolerance. *Plant Physiol.* **175**: 1321-1336.
- Richter, R., Bastakis, E., y Schwechheimer, C.** (2013). Cross-Repressive Interactions between SOC1 and the GATAs GNC and GNL/CGA1 in the Control of Greening, Cold Tolerance, and Flowering Time in Arabidopsis. *PLANT Physiol.* **162**: 1992-2004.
- Rinn, J.L. y Chang, H.Y.** (2012). Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **81**: 145-166.
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., y Pandolfi, P.P.** (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell* **146**: 353-358.
- Schubert, D., Primavesi, L., Bishopp, A., Roberts, G., Doonan, J., Jenuwein, T., y Goodrich, J.** (2006). Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *EMBO J.* **25**: 4638-4649.
- Seo, E., Lee, H., Jeon, J., Park, H., Kim, J., Noh, Y.-S., y Lee, I.** (2009). Crosstalk between cold response and flowering in Arabidopsis is mediated through the flowering-time gene SOC1 and its upstream negative regulator FLC. *Plant Cell* **21**: 3185-3197.
- Seo, J.S., Diloknawarit, P., Park, B.S., y Chua, N.-H.** (2019). ELF18-INDUCED LONG NONCODING RNA 1 evicts fibrillarin from mediator subunit to enhance PATHOGENESIS-RELATED GENE 1 (PR1) expression. *New Phytol.* **221**: 2067-2079.
- Shen, Y., Conde E Silva, N., Audonnet, L., Servet, C., Wei, W., y Zhou, D.-X.** (2014). Over-expression of histone H3K4 demethylase gene JMJ15 enhances salt tolerance in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **5**: 290.
- Shi, Y., Ding, Y., y Yang, S.** (2018). Molecular Regulation of CBF Signaling in Cold Acclimation. *Trends Plant Sci.* **23**: 623-637.
- Shi, Y., Huang, J., Sun, T., Wang, X., Zhu, C., Ai, Y., y Gu, H.** (2017). The precise regulation of different COR genes by individual CBF transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *J. Integr. Plant Biol.* **59**: 118-133.
- Shi, Y., Tian, S., Hou, L., Huang, X., Zhang, X., Guo, H., y Yang, S.** (2012). Ethylene Signaling Negatively Regulates Freezing Tolerance by Repressing Expression of CBF and Type-A ARR Genes in Arabidopsis. *Plant Cell*.
- Shi, Y.Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., y Shi, Y.Y.** (2004). Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell* **119**.
- Shin, S.-Y., Jeong, J.S., Lim, J.Y., Kim, T., Park, J.H., Kim, J.-K., y Shin, C.** (2018). Transcriptomic analyses of rice (*Oryza sativa*) genes and non-coding RNAs under nitrogen starvation using multiple omics technologies. *BMC Genomics* **19**: 532.
- Singh, P.K., Ganguli, S., y Pal, A.** (2018). Functions of long non-coding RNAs in plants: a riddle to explore. *Nucl.* **61**: 261-272.
- Song, J.B., Gao, S., Wang, Y., Li, B.W., Zhang, Y.L., y Yang, Z.M.** (2016a). MiR394 and its target gene LCR are involved in cold stress response in Arabidopsis. *Plant Gene* **5**: 56-64.
- Song, X., Liu, G., Huang, Z., Duan, W., Tan, H., Li, Y., y Hou, X.** (2016b). Temperature expression patterns of genes and their coexpression with LncRNAs revealed by RNA-Seq in non-heading Chinese cabbage.

BMC Genomics **17**: 297.

- Song, Y., Ci, D., Tian, M., Zhang, D., y Sunkar, R.** (2015). Stable methylation of a non-coding RNA gene regulates gene expression in response to abiotic stress in *Populus simonii*. *J. Exp. Bot.* **67**: 1477-1492.
- Spedaletti, V., Polticelli, F., Capodaglio, V., Schininà, M.E., Stano, P., Federico, R., y Tavladoraki, P.** (2008). Characterization of a Lysine-Specific Histone Demethylase from *Arabidopsis thaliana* <sup>†</sup>. *Biochemistry* **47**: 4936-4947.
- St.Laurent, G., Wahlestedt, C., Kapranov, P., St Laurent, G., Wahlestedt, C., Kapranov, P., St.Laurent, G., Wahlestedt, C., y Kapranov, P.** (2015). The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genet.* **31**: 239-251.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., y Thomashow, M.F.** (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 1035-1040.
- Swiezewski, S., Liu, F., Magusin, A., y Dean, C.** (2009). Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature* **462**: 799-802.
- Szczesniak, M.W., Bryzghalov, O., Ciomborowska-Basheer, J., y Makalowska, I.** (2019). CANTATAdB 2.0: Expanding the Collection of Plant Long Noncoding RNAs. *Methods Mol. Biol.* **1933**: 415-429.
- Thomashow, M.F.** (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 571-599.
- Tian, Y., Zheng, H., Zhang, F., Wang, S., Ji, X., Xu, C., He, Y., y Ding, Y.** (2019). PRC2 recruitment and H3K27me3 deposition at *FLC* require FCA binding of *COOLAIR*. *Sci. Adv.* **5**: eaau7246.
- Tsai, M.-C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., y Chang, H.Y.** (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* **329**: 689-93.
- Uliitsky, I.** (2016). Evolution to the rescue: using comparative genomics to understand long non-coding RNAs. *Nat. Rev. Genet.* **17**.
- Wang, P., Dai, L., Ai, J., Wang, Y., y Ren, F.** (2019). Identification and functional prediction of cold-related long non-coding RNA (lncRNA) in grapevine. *Sci. Rep.* **9**: 6638.
- Wang, T.-Z., Liu, M., Zhao, M.-G., Chen, R., y Zhang, W.-H.** (2015). Identification and characterization of long non-coding RNAs involved in osmotic and salt stress in *Medicago truncatula* using genome-wide high-throughput sequencing. *BMC Plant Biol.* **15**: 131.
- Wang, Y., An, C., Zhang, X., Yao, J., Zhang, Y., Sun, Y., Yu, F., Amador, D.M., y Mou, Z.** (2013). The *Arabidopsis* Elongator Complex Subunit2 Epigenetically Regulates Plant Immune Responses. *Plant Cell* **25**: 762-776.
- Wang, Y., Fan, X., Lin, F., He, G., Terzaghi, W., Zhu, D., y Deng, X.W.** (2014). *Arabidopsis* noncoding RNA mediates control of photomorphogenesis by red light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Wanner, L.A. y Junttila, O.** (1999). Cold-Induced Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **120**: 391-400.
- Wickens, M., Bernstein, D.S., Kimble, J., y Parker, R.** (2002). A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet.*
- Wierzbicki, A.T.** (2012). The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 517-522.
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R., y Pikaard, C.S.** (2009). RNA polymerase v transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat. Genet.* **41**: 630-4.
- Wu, C., Ding, Z., Chen, M., Yang, G., Tie, W., Yan, Y., Zeng, J., He, G., y Hu, W.** (2019). Identification and functional prediction of lncRNAs in response to PEG and ABA treatment in cassava. *Environ. Exp. Bot.* **166**: 103809.
- Wu, H.-W.W., Deng, S., Xu, H., Mao, H.-Z.Z., Liu, J., Niu, Q.-W.W., Wang, H., y Chua, N.-H.H.** (2018). A noncoding RNA transcribed from the AGAMOUS (AG) second intron binds to CURLY LEAF and represses AG expression in leaves. *New Phytol.* **219**: 1480-1491.
- Wu, H., Wang, Z.-M., Wang, M., y Wang, X.** (2013). Widespread long noncoding RNAs as endogenous target mimics for microRNAs in plants. *Plant Physiol.* **161**: 1875-84.
- Wu, R., Su, Y., Wu, H., Dai, Y., Zhao, M., y Lu, Q.** (2016). Characters, functions and clinical perspectives of long non-coding RNAs. *Mol. Genet. Genomics* **291**: 1013-1033.
- Xiao, J. et al.** (2017). Cis and trans determinants of epigenetic silencing by Polycomb repressive complex 2 in

- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., y Zhu, J.K.** (2001). The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **13**: 2063-83.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Swinburne, J., Coupland, G., Tucker, W.Q.J., Gerentes, D., Perez, P., y Smyth, D.R.** (1994). A Novel cis-Acting Element in an Arabidopsis Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress. *PLANT CELL ONLINE* **6**: 251-264.
- Yamanaka, Y., Faghihi, M.A., Magistri, M., Alvarez-Garcia, O., Lotz, M., y Wahlestedt, C.** (2015). Antisense RNA controls LRP1 Sense transcript expression through interaction with a chromatin-associated protein, HMGB2. *Cell Rep.* **11**: 967-976.
- Yan, J., Zhao, C., Zhou, J., Yang, Y., Wang, P., Zhu, X., Tang, G., Bressan, R.A., y Zhu, J.K.** (2016). The miR165/166 Mediated Regulatory Module Plays Critical Roles in ABA Homeostasis and Response in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* **12**: 1-17.
- Yang, Z., Zhu, Q., Luo, K., y Zhou, Q.** (2001). The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature* **414**: 317-322.
- Yao, R.-W., Wang, Y., y Chen, L.-L.** (2019). Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nat. Cell Biol.* **21**: 542-551.
- Ye, R., Wang, W., Iki, T., Liu, C., Wu, Y., Ishikawa, M., Zhou, X., y Qi, Y.** (2012). Cytoplasmic Assembly and Selective Nuclear Import of Arabidopsis ARGONAUTE4/siRNA Complexes. *Mol. Cell* **46**: 859-870.
- Yoon, J.-H., Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Yang, X., Martindale, J.L., De, S., Huarte, M., Zhan, M., Becker, K.G., y Gorospe, M.** (2012). LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol. Cell* **47**: 648-655.
- Yu, A., Lepère, G., Jay, F., Wang, J., Bapaume, L., Wang, Y., Abraham, A.L., Penterman, J., Fischer, R.L., Voinnet, O., y Navarro, L.** (2013). Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in Arabidopsis antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Zhang, H. y Zhu, J.-K.** (2011). RNA-directed DNA methylation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 142-7.
- Zhang, X.L., Jiang, L., Xin, Q., Liu, Y., Tan, J.X., y Chen, Z.Z.** (2015). Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Front. Plant Sci.* **6**: 88.
- Zhao, C., Zhang, Z., Xie, S., Si, T., Li, Y., y Zhu, J.-K.** (2016). Mutational Evidence for the Critical Role of CBFs Genes in Cold Acclimation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **171**: pp.00533.2016.
- Zhao, X., Li, J., Lian, B., Gu, H., Li, Y., y Qi, Y.** (2018). Global identification of Arabidopsis lncRNAs reveals the regulation of MAF4 by a natural antisense RNA. *Nat. Commun.* **9**: 5056.
- Zhou, J. et al.** (2015). H19 lncRNA alters DNA methylation genome wide by regulating S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Nat. Commun.* **6**: 10221.
- Zhou, X., Wang, G., Sutoh, K., Zhu, J.K., y Zhang, W.** (2008). Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*
- Zilberman, D., Cao, X., y Jacobsen, S.E.** (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* (80-. ).







## **ANEXO I. ABREVIATURAS**



**Lista de abreviaturas utilizadas en esta Tesis**

5'CAP	Caperuza N7-metilguanosina en el extremo 5' de un mRNA
ABA	Ácido abscísico
amiR	Micro RNA artificial ( <i>Artificial micro RNA</i> )
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
ceRNA	RNA endógeno competitivo ( <i>Competing endogenous RNA</i> )
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina ( <i>Chromatin immunoprecipitation</i> )
Col-0	Ecotipo Columbia
COR	Genes regulados por frío ( <i>Cold Regulated genes</i> )
CRISPR/CAS9	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespa- das / Proteína asociada a CRISPR 9 ( <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated protein 9</i> )
CRT/DRE	<i>C-repeat/dehydration-responsive element</i>
CTs	Ciclos umbrales
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENCODE	Enciclopedia de Elementos de DNA
eTM	<i>Endogenous targets mimics</i>
GFP	Proteína de fluorescencia verde ( <i>Green Fluorescence Protein</i> )
GK	GABI-Kat
GM	Medio de germinación ( <i>Germination medium</i> )
H3K27me3	Trimetilación en la lisina 27 de la histona H3
H3K36me3	Trimetilación en la lisina 36 de la histona H3
H3K4me3	Trimetilación en la lisina 4 de la histona H3
HD/ZIPIII	<i>Class III Homeodomain Leucine Zipper</i>
IgG	Inmunoglobulina G
Kb	Kilobase
lncRNA	RNA largo no codificante ( <i>Long non-coding RNA</i> )
LT <sub>50</sub>	Temperatura a la que la mortalidad es del 50%
MES	2-(N-morfolino) ácido etanosulfónico
miRNA	Micro RNA
MRE	Elemento de reconocimiento de miRNAs ( <i>microRNA recognition element</i> )
mRNA	RNA mensajero
NAT-AS	<i>Natural antisense</i>
ncRNA	RNA no codificante ( <i>non-coding RNA</i> )
NSR	<i>Nuclear speckle RNA-binding proteins</i>
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRC2	<i>Polycomb repressive complex 2</i>
PSCD	(Base de datos de estados de la cromatina) <i>Plant Chromatin State Database</i>
qPCR	PCR cuantitativa ( <i>Quantitative PCR</i> )

RACE	Amplificación rápida de extremos del cDNA ( <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> )
RdDM	Metilación de DNA mediado por RNA ( <i>RNA-directed DNA methylation</i> )
RIP	Inmunoprecipitación nuclear in vivo ( <i>RNA ImmunoPrecipitation in vivo</i> )
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Secuenciación masiva de RNA ( <i>RNA-sequencing</i> )
rRNA	ARN ribosómico ( <i>Ribosomal RNA</i> )
RT-PCR	PCR en tiempo real ( <i>Real Time PCR</i> )
SDS	Dodecilsulfato sódico
snoRNA	ARN pequeño nucleolar ( <i>Small nucleolar RNA</i> )
snRNA	ARN pequeño nuclear ( <i>Small nuclear RNA</i> )
sRNA	ARN pequeño ( <i>Small RNA</i> )
T-DNA	<i>Transferred DNA</i>
TE	Tampón Tris-EDTA
tRNA	RNA transferente ( <i>Transfer RNA</i> )
U	Unidad de actividad enzimática
v/v	Volumen/volumen

### **Nombre completo de los genes mencionados en esta Tesis**

<i>ABI4</i>	<i>ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4</i>
<i>AG-incRNA4</i>	<i>AGAMOUS INTERGENIC NONCODING RNA 4</i>
<i>AGO4</i>	<i>ARGONAUTE 4</i>
<i>APOLO</i>	<i>ARABIDOPSIS LONG INTERGENIC NONCODING RNA</i>
<i>ASCO-RNA</i>	<i>ALTERNATIVE SPLICING COMPETITOR LONG NON-CODING RNA</i>
<i>ATHB8</i>	<i>HOMEODOMAIN GENE 8</i>
<i>BG1</i>	<i>BETA-1,3-GLUCANASE 1</i>
<i>BZR1</i>	<i>BRASSINAZOLE-RESISTANT 1</i>
<i>CAMTA5</i>	<i>CALMODULIN BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR 5</i>
<i>CBF</i>	<i>C-REPEAT BINDING FACTOR</i>
<i>CCA1</i>	<i>CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1</i>
<i>CES</i>	<i>CESTRA</i>
<i>CHI</i>	<i>CHALCONE ISOMERASE</i>
<i>CHS</i>	<i>CHALCONE SYNTHASE</i>
<i>CLF</i>	<i>CURLY LEAF</i>
<i>COLDAIR</i>	<i>COLD ASSISTED INTRONIC NONCODING RNA</i>
<i>COLDWRAP</i>	<i>COLD OF WINTER-INDUCED NONCODING RNA FROM PROMOTER</i>
<i>COOLAIR</i>	<i>COLD INDUCED LONG ANTISENSE INTRAGENIC RNA</i>
<i>COR15A</i>	<i>COLD REGULATED 15A</i>
<i>COR15A</i>	<i>COLD REGULATED 47</i>
<i>DUO3</i>	<i>DUO POLLEN 3</i>
<i>EIN3</i>	<i>ETHYLENE INSENSITIVE 3 FAMILY PROTEIN</i>
<i>ELENA1</i>	<i>ELF18-INDUCED LONG NONCODING RNA</i>
<i>FES1A</i>	<i>ARABIDOPSIS ORTHOLOGS OF HUMAN HSP70 BINDING PROTEIN</i>
<i>FLC</i>	<i>FLOWERING LOCUS C</i>
<i>GOLS3</i>	<i>GALACTINOL SYNTHASE 3</i>

<i>HOTAIR</i>	<i>HOX TRANSCRIPT ANTISENSE INTERGENIC RNA</i>
<i>HSFA1s</i>	<i>A1 HEAT SHOCK FACTORS</i>
<i>HSP101</i>	<i>HEAT SHOCK PROTEIN 101</i>
<i>HSP70</i>	<i>HEAT SHOCK PROTEIN 70</i>
<i>HY5</i>	<i>ELONGATED HYPOCOTYL 5</i>
<i>ICE1</i>	<i>INDUCER OF CBF EXPRESSION 1</i>
<i>ICE2</i>	<i>INDUCER OF CBF EXPRESSION 2</i>
<i>ICU4</i>	<i>INCURVATA 4</i>
<i>IPS1</i>	<i>INDUCED BY PHOSPHATE STARVATION1</i>
<i>KIN1</i>	<i>COLD INDUCIBLE 1</i>
<i>LDL</i>	<i>LSD1-LIKE</i>
<i>LHP1</i>	<i>LIKE HETEROCHROMATIC PROTEIN 1</i>
<i>LOS4</i>	<i>LOW EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES4</i>
<i>MAF4</i>	<i>MADS AFFECTING FLOWERING 4</i>
<i>MAS</i>	<i>MAF4 ANTISENSE</i>
<i>MYB15</i>	<i>MYELOBLASTOSIS 15</i>
<i>NPR1</i>	<i>NONEXPRESSER OF PR GENES 1</i>
<i>NUP160</i>	<i>NUCLEOPORIN160</i>
<i>PAP29</i>	<i>PURPLE ACID PHOSPHATASE 29</i>
<i>PHB</i>	<i>PHABULOSA</i>
<i>PHO2</i>	<i>PHOSPHATE 2</i>
<i>PHV</i>	<i>PHAVOLUTA</i>
<i>PID</i>	<i>PINOID</i>
<i>PIF3</i>	<i>PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3</i>
<i>PIF4</i>	<i>PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4</i>
<i>PIF7</i>	<i>PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 7</i>
<i>PR1</i>	<i>PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1</i>
<i>PR2</i>	<i>PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 2</i>
<i>PR5</i>	<i>PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 5</i>
<i>PRR5</i>	<i>PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5</i>
<i>PRR7</i>	<i>PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7</i>
<i>PRR9</i>	<i>PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 9</i>
<i>RAB18</i>	<i>RESPONSE TO ABA 18</i>
<i>REV</i>	<i>REVOLUTA</i>
<i>RICA</i>	<i>REGULATED IN COLD ACCLIMATION</i>
<i>SOC1</i>	<i>SUPPRESSOR OF CLR PROTEIN 1</i>
<i>SVK</i>	<i>SVALKA</i>
<i>SWN</i>	<i>SWINGER</i>
<i>TOC1</i>	<i>TIMING OF CAB EXPRESSION 1</i>
<i>WDR5a</i>	<i>HOMOLOGOUS OF COMPASS-LIKE COMPLEX</i>
<i>WRKY46</i>	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 46</i>
<i>XERO2</i>	<i>DEHYDRIN XERO 2</i>





**ANEXO II. OLIGONUCLEÓTIDOS**



**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en esta Tesis**

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'
<b>Genotipado de líneas mutantes</b>	
LB Gabi-KAT	GGGCTACACTGAATTGGTAGCTC
LB SALK 1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
LB SALK 2005	GAACAACACTCAACCCTATCTCGG
RICA1-F	CCCACACCCCATTTCTTGAG
RICA1-R	GACACACAACCTACCAATTACCAACC
RICA2-F	GGGGAGACTTTTGTTTGCCTTTCTTAG
RICA2-R	GTGTTTAATCACAGCTTGCCCCTGCC
RICA3-F	TCTCCAGCCAGCGCACTTCC
RICA3-R	ACGCTCTAAGTCTAAGCCAAGGGGG
RICA4-F	TCTCCAGCCAGCGCACTTCC
RICA4-R	CCATTGTCCATACCTTCTCTTC
<b>Clonajes</b>	
c-RICA4-F	CTAGAGGATCCCCGGGTACCCGCCTGAGGAAACCG AAGAC
c-RICA4-R	CCGCTCTAGAACTAGTCGTTTTCTACTTCTTTGCTTC ACA
c-RICA3-F	CTAGAGGATCCCCGGGTACC TTGGAGTGAGAGCTTGCTGT
c-RICA3-R	CCGCTCTAGAACTAG TCAGTTTCAGTATAAGTGTGGGCT
amiR-RICA1-F	TGTATCGAGGACCTCAAGGTGACTAATGATGATCAC ATTCGTTATCTATTTTTTTAGTCACCTTTAGGTCCTCG A
amiR-RICA1-R	AATGTCGAGGACCTAAAGGTGACTAAAAAATAGATA ACGAATGTGATCATCATTAGTCACCTTGAGGTCCTCG A
amiR-RICA2-F	TGTATTCTAATACGGATCGTGTCTAATGATGATCACA TTCGTTATCTATTTTTTTAGACACGATACGTATTAGAA
amiR-RICA2-R	AATGTTCTAATACGTATCGTGTCTAAAAAATAGATAA CGAATGTGATCATCATTAGACACGATCCGTATTAGAA
<b>RACE</b>	
3' RACE Adapter	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGT
3' RACE Inner Primer	CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG
3' RACE Outer Primer	GCGAGCACAGAATTAATACGACT
3' RACE RICA1 R1	AAGTATGTTTCTTGCTTCAGTTCTT
3' RACE RICA1 R2	GGAAGCTATTGTCCTGGCTAACTCAC

3' RACE RICA2 R1	CTGCGATTTCTTATTATACGTTTGT
3' RACE RICA2 R2	GGGAACTACACATTATATGATTG
3' RACE RICA3 R1	CTCTTCTTCTCCCCCTTGGC
3' RACE RICA3 R2	AATGTTACCGTCCCTTCGCTAC
3' RACE RICA4 R1	AGCCAGCGCACTTCCTTCTCAC
3' RACE RICA4 R2	CTACCTCTTCCCCACCTT
5' RACE Adapter	GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGG CUUUGAUGAAA
5' RACE Inner Primer	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG
5' RACE Outer Primer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
5' RACE RICA1	TTATTTTAAAAAGGCCAAACACA
5' RACE RICA2	GGGGAGACTTTTGTTTGCGTTTTCTTAG
5' RACE RICA3 R1	GGCTCCTCTTGTAACCAATGTC
5' RACE RICA3 R2	ACTATATCGGTCTAATCCTTGGC
5' RACE RICA4 R1	TATGCCACAAACCTGC
5' RACE RICA4 R2	TGGCTCGTCTCGAATCTAGC

#### qRT-PCR

18S RNA-qPCR-F	TCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTG
18S RNA-qPCR-R	CCGTGTCAGGATTGGGTAATTT
AT1G35710-qPCR-F	CGAACTCATCAAAGTCTTC
AT1G35710-qPCR-R	CAGTGTTAGTGAGGTTTAACTCT
CBF1-qPCR-F	GTCAACATGCGCCAAGGATA
CBF1-qPCR-R	TCGGCATCCCAAACATTGTC
CBF2-qPCR-F	GAATCCCGGAATCAACCTGT
CBF2-qPCR-R	CCCAACATCGCCTCTTCATC
CBF3-ChIP-F	CAACTTGCGCTAAGGACA
CBF3-ChIP-R	TCTCAAACATCGCCTCAT
CBF3-qPCR-F	CAACTTGCGCTAAGGACA
CBF3-qPCR-R	TCTCAAACATCGCCTCAT
CHI-qPCR-F	TCGCTCTCTCCCCTACCGGC
CHI-qPCR-R	TCCAGAACCGCCTCCGCCAA
CHS-qPCR-F	TCGCCGAGAACAAACCGTGGA
CHS-qPCR-R	CGGCGGCGCCATCACTGAAA
COR15A-qPCR-F	GAAACCGCAGATACATTGGG
COR15A-qPCR-R	TAACTGATTAGGTAAGACCC
COR15B-qPCR-F	CCAATGAACTGCGACTGAG
COR15B-qPCR-R	ATGAGTGATTGAATCAGGAC
COR47-qPCR-F	TCGTTGATTGCATTTGATCC
COR47-qPCR-R	CACACACAACTTACACAAAC
FES1A-qPCR-F	TAGTGACGATGCTGAGAT
FES1A-qPCR-R	TCTATGCTGCTACTTCCA
GOLS3-qPCR-F	AGGGAAGACATCAAGATGCTT
GOLS3-qPCR-R	GCACATCAGCTTCAGACAAAT

HSP101-qPCR-F	TGCAGGGCTAACTGGGAAAG
HSP101-qPCR-R	GCCTGTTCAAGAGCTCTGGT
HSP70-qPCR-F	GCCGGTGGTGTATGACTGTT
HSP70-qPCR-R	CTGGTTGTCTGAATAGGTAG
ICU4-qPCR-F	GGATGGTAAGTTGGGATGT
ICU4-qPCR-R	TGCTGACGGCGAATAGAAC
KIN1-qPCR-F	ATTCGGGTCAAATTTGGGAG
KIN1-qPCR-R	TGAATATAAGTTTGGCTCGTC
NPR1-qPCR-F	TTTGTCTCTGTTTGTCTTC
NPR1-qPCR-R	TATGGCGGTTGAATGTAA
PHB-qPCR-F	CCAGCAGGACTCCTTTCTAT
PHB-qPCR-R	TGCGCGAAATAGCGACTATG
PHV-qPCR-F	CCAGCTAATCTTCTCTCGAT
PHV-qPCR-R	TGCGTGAAACAGCTACGATA
PR1-qPCR-F	TCGGATGTGCCAAAGTGAGGTGT
PR1-qPCR-R	TGGCTTCTCGTTTACATAATCCCACG
PR2-qPCR-F	TGGATCACCGAGAAGGCCAGGG
PR2-qPCR-R	TGTCGATCTGGATGAAACAGTCCCCA
PR5-qPCR-F	CCACAGCACAGAGACACA
PR5-qPCR-F-R	TGATGAACACGAGGAAGAGAAT
RAB18-qPCR-F	AGCAGCAGTATGACGAGTAC
RAB18-qPCR-R	CAGTTCCAAAGCCTTCAGTC
RD29A-qPCR-F	CTGAAGAACGAATCTGATATCG
RD29A-qPCR-R	CCAGGTCTTCCCTTCGCCAG
RICA1-qPCR F	CCTGGCTAACTCACCTTGAGGTCC
RICA1-qPCR R	TGAAATGGATCGGACCAGGAATGC
RICA2-qPCR F	GATGGACAATTGGAAGATATG
RICA2-qPCR R	TGATGTACCTTCGCTAACA
RICA3-qPCR F	CGTTTCTCTCTCTCGCTACCTC
RICA3-qPCR R	CGCGCACCATTTCCTTGTCG
RICA4-qPCR F	CTACCTCTTCCCCACCTT
RICA4-qPCR R	TCTTCTCGTTGTCTGCTTG
U6-qPCR-F	AATTGGAACGATACAGAGAAGA
U6-qPCR-R	GGACCATTCTCTCGATTTATGCG
WRKY46-qPCR-F	ACATCATCACATCCCCGAAGACG
WRKY46-qPCR-r	ACTTCTTCGGACTTGGTCGG
XERO2-qPCR-F	TTCCCGGTGGTCATCACTAG
XERO2-qRT-R1	GCGACTCAATGAAAGAAAGCCAC
RICA2-cDNA	AATTATCCGATATTTGAACATAAA
specific primer	
RICA2-semiqPCR-F	GTGTTTAATCACAGCTTGCCCCTGCC
RICA2-semiqPCR-R	GGGGAGACTTTTGTTCGTTTCTTAG
Tubulina-semiqPCR-F	TTTGGAGCCTGGGACTATGGAT
Tubulina-semiqPCR-R	ACGGGGGAATGGGATGAGAT





